



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS DO MAR  
CURSO DE OCEANOGRAFIA**

**DAVI DE ARAÚJO MARTINS**

**USO DE MARCADORES MOLECULARES NA AVALIAÇÃO DA CONTAMINAÇÃO  
EM ESTUÁRIO DO NORDESTE BRASILEIRO: CASO DO SISTEMA ESTUARINO  
UBATUBA/TIMONHA**

**FORTALEZA**

**2017**

DAVI DE ARAÚJO MARTINS

USO DE MARCADORES MOLECULARES NA AVALIAÇÃO DA CONTAMINAÇÃO  
EM ESTUÁRIO DO NORDESTE BRASILEIRO: CASO DO SISTEMA ESTUARINO  
UBATUBA/TIMONHA

Monografia apresentada ao Curso de Oceanografia do Instituto de Ciências do Mar (LABOMAR) da Universidade Federal do Ceará, como requisito à obtenção do Título de Bacharel em Oceanografia.

Orientador: Prof. Dr. Rivelino Martins Cavalcante.

Coorientadora: Msc. Pollyana Cristina Vasconcelos de Moraes.

FORTALEZA

2017

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação  
Universidade Federal do Ceará  
Biblioteca Universitária

Gerada automaticamente pelo módulo Catalog, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

---

M342u Martins, Davi de Araújo.

Uso de marcadores moleculares na avaliação da contaminação em estuário do nordeste brasileiro: caso do sistema estuarino Ubatuba/Timonha / Davi de Araújo Martins. – 2017.  
63 f. : il. color.

Trabalho de Conclusão de Curso (graduação) – Universidade Federal do Ceará, Instituto de Ciências do Mar, Curso de Oceanografia, Fortaleza, 2017.

Orientação: Prof. Dr. Rivelino Martins Cavalcante.

Coorientação: Prof. Me. Pollyana Cristina Vasconcelos de Moraes.

1. Sedimento. 2. Contaminação. 3. Cromatografia Gasosa. I. Título.

CDD 551.46

---

DAVI DE ARAÚJO MARTINS

USO DE MARCADORES MOLECULARES NA AVALIAÇÃO DA CONTAMINAÇÃO  
EM ESTUÁRIO DO NORDESTE BRASILEIRO: CASO DO SISTEMA ESTUARINO  
UBATUBA/TIMONHA

Monografia apresentada ao curso de graduação em Oceanografia do Instituto de Ciências do Mar da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial à obtenção do título de Bacharel em Oceanografia.

Aprovada em: \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_\_\_.

BANCA EXAMINADORA

---

Prof. Dr. Rivelino Martins Cavalcante (Orientador)

Universidade Federal do Ceará (UFC)

---

Msc. Pollyana Cristina Vasconcelos de Moraes (Co- Orientadora)

Universidade Federal do Ceará (UFC)

---

Prof. Dra. Sarah de Abreu Moreira

(IFCE - Instituto Federal do Ceará - Campus de Sobral)

---

Msc. Marcielly Freitas Bezerra de Lima

(UFC – Universidade Federal do Ceará)

A Deus.

Aos meus pais.

Aos meus irmãos, Gabriel e Thor.

## **AGRADECIMENTOS**

- Araguari, alvorada.

Agradeço aos meus pais que não mediram esforços e proporcionaram o necessário para eu conseguir chegar até aqui.

Aos meus irmãos pelo companheirismo.

Ao professor Rivelino Martins Cavalcante por ter me dado à oportunidade de trabalhar em seu laboratório, em que passei bons momentos da minha graduação e aprendi inúmeras lições que me ajudarão no mundo profissional. Obrigado pela orientação, pelos ensinamentos, pela paciência, compreensão e por estar sempre disponível para ajudar.

A Pollyana Moraes que sempre me ajudou, fez parceria nos melhores e piores momentos. Agradeço por todos os ensinamentos, conversas sérias e descontraídas tanto acadêmicas quanto pessoais. Você é uma pessoa especial, simples, sincera e esta amizade eu quero poder levar para o resto da minha vida, pois encontrar pessoas que sejam tão parecidas com você é raro.

Ao GRUPO CERTO PIONEIRO: Ana Beatriz pela parceria, inúmeras ajudas, conselhos e por ser meu suporte, me fazer enxergar as soluções para os problemas da vida e ter contribuído em etapas da realização desse trabalho. Débora Moraes (Do lar), Felipe Rodrigues por toda ajuda e trabalhos realizados juntos em laboratório, caronas e 4 Stylos! Karina Gurgel, Lucas Arruda pelas reflexões na Trevo, Melissa Fontenelle, Nalu Maia, Thomas Ravelly e Oscar Sousa. A vocês por todos os momentos que passamos nessa graduação juntos. Nos unimos para vencer todas as etapas desse curso e aqui estamos quase formados. Foram noites sem dormir, grupos de estudos, apresentações (humilhações em público) e momentos de lazer que nunca esquecerei.

As LACORIANAS: Lígia, Gabi, Marcielly, Camille, Íthala, Tamiris, Elissandra, Luana, Luanny. A Wersângela primeira pessoa que trabalhei e me ensinou muito. A Allyne pela companhia, caronas e aprendizados, você é uma ótima pessoa.

Aos meus amigos de escola: Ionara, Lucas Lima, Stefanny e Vanusa que até hoje continuamos unidos mesmo nos vendo apenas uma vez ao ano e se nos encontramos duas vezes: - É Recorde!

Ao Programa de Educação Tutorial (PET), tutoriado pela professora Oziléa e Carlos Teixeira. Essa foi minha primeira bolsa na graduação e onde passei quase dois anos.

Aos professores do curso de Oceanografia da UFC por todos os ensinamentos que obtive nesses quatro anos de graduação. Em especial ao professor Rivelino mais uma vez por ter nos apresentado as resoluções do CONAMA!

A Ingrid Santana, secretária do Curso de Oceanografia. Esta pessoa competente, que resolve toda burocracia de forma inteligente e rápida. Você merece uma promoção!

Aos integrantes do Laboratório de Oceanografia Geológica, principalmente pela ajuda do Regimário nas análises granulométricas.

Agradeço ao Laboratório de Análise Traço (LAT) em nome do Professor Ronaldo Nascimento pela parceria e disponibilidade para o uso do equipamento de cromatografia.

A Universidade Federal do Ceará.

A Katherine Fiedler Choi-Lima pela disponibilização dos dados, juntamente com a Fundação Boticário e The Rufford.

A Sarah de Abreu e Marcielly Freitas, integrantes da banca examinadora pela presença e contribuições para aperfeiçoar este trabalho.

## RESUMO

Os sedimentos são um importante componente do ambiente marinho, uma vez que constituem um habitat, um recurso trófico e um local de desova para vários organismos. Infelizmente, os sedimentos das áreas costeiras são profundamente degradados por atividades antropogênicas. Este trabalho foi realizado no Sistema estuarino Ubatuba/Timonha uma área localizada na divisa entre os estados do Ceará e Piauí e que por sua vez está inserida dentro de uma área de preservação ambiental: APA do Delta do Parnaíba. Visa-se realizar uma avaliação da contaminação deste ambiente utilizando para isso a determinação de esteróis e disruptores endócrinos em sedimentos por cromatografia gasosa acoplada a um espectrômetro de massa (CG-EM). Como resultado da pesquisa o somatório de DEs variou de 67,65 a 175,46 ng/g. Dentre os sintéticos o MeEE2 e 17 $\alpha$ -EE2 destacaram-se por suas concentrações máximas de 301,09 ng/g (P4) e 321,71 ng/g (P8) respectivamente. Já o somatório de esteróis variou de 3,85 (P1) – 351,62 ng/g (P3). Levando em consideração o Coprostanol, esterol fecal, ele teve concentrações variando de ND (P1) – 71,72 (P6) ng/g sendo os pontos P2, P4, P5 e P8 classificados como contaminados segundo os autores utilizados como referência. Com a análise de componente principal foi observado o aporte de efluentes domésticos.

**Palavras-chave:** Sedimento. Contaminação. Cromatografia Gasosa.



## ABSTRACT

Sediments are an important component of the marine environment, once they constitute a habitat, a trophic resource and a spawning place for many organisms. Unfortunately, the sediments from coastal areas are deeply degraded by anthropogenic activities. This work was developed at the Ubatuba/Timonha estuarine system, an area located at the border of the Ceará and Piauí states and which is inserted within an environmental preservation area: Parnaíba delta. This work aims to do an evaluation of the contamination on this environment using the determination of sterols and endocrine disrupters in sediments by gas chromatography coupled to a mass spectrometer (GC-MS). As the research's result, the sum of Des varied from 67.65 to 175.46 ng/g. Among the synthetics, the MeEE2 and 17 $\alpha$ -EE2 stood out for their maximum concentrations of 301.09 (P4) and 321.71 (P8), respectively. The sum of sterols varied from 3.85 (P1) - 351.62 ng/g (P3). Considering Coprostanol, fecal sterol, it presented concentrations varying from ND (P1) – 71.72 (P6) ng/g with points P2, P4, P5 and P8 classified as contaminated according to the authors used as reference. With the principal component analysis, the contribution of domestic effluents was observed.

Key words: Sediment, Contamination, Gas chromatography.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Estrutura de um esterol. ....	20
Figura 2: Localização da área de estudo. ....	26
Figura 3: Localização dos pontos de amostragem .....	28
Figura 4: Fluxograma das etapas seguidas para a determinação dos compostos. ....	33
Figura 5: Equipamentos usados na extração: a) Rotaevaporador, b) Banho Ultrasom e c) Centrifuga. ....	34
Figura 6: Amostras em banho de areia; termômetro para o melhor controle da temperatura. ....	36
Figura 7: Cromatógrafo gasoso acoplado a um espectrômetro de massa (CG-EM) .....	37

## LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1: Percentual de argila, cascalho e areia nas amostras sedimentares. ....	42
Gráfico 2: Teor de MO em sedimento.....	44
Gráfico 3: Porcentagem de AH e AF em sedimento.....	45
Gráfico 4: Concentrações de Esteróis em sedimento. ....	46
Gráfico 5: Razão Coprostanol/Colesterol.....	48
Gráfico 6: Razão Coprostanol/ (Colesterol + Colesterol).....	49
Gráfico 7: Razão Coprostanol / (Coprostanol+Colesterol).....	49
Gráfico 8: Razão Coprostanol / Colesterol.....	50
Gráfico 9: Concentrações de DEs em sedimento.....	51
Gráfico 10: PCA.....	54

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Características dos esteróis presentes nesse estudo. ....	21
Tabela 2: Razões de diagnóstico entre o Coprostanol e outros esteróis. ....	22
Tabela 3: Características dos disruptores endócrinos presentes nesse estudo. ....	23
Tabela 4: Misturas de solventes usados na etapa de extração .....	34
Tabela 5: Frações extraídas na etapa de <i>clean up</i> .....	35
Tabela 6: Tempos de retenção e razões massa/carga (m/z).....	38
Tabela 7: Controle de qualidade dos dados. ....	40
Tabela 8: Classificação granulométrica das amostras de sedimento .....	43
Tabela 9: Concentrações de Coprostanol em sedimento de distintos estudos. ....	47
Tabela 10: Concentrações de DEs encontradas em outros estudos.....	52
Tabela 11: Coeficiente de correlação não linear <i>Spearman</i> .....	55

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ACP	Análise de Componentes Principais
AF	Ácidos Fúlvicos
AH	Ácidos Húmicos
CG-EM	Cromatografia Gasosa com Espectrometria de Massas
COL	Colesterol
COLN	Colestanol
CONAMA	Conselho Nacional do Meio Ambiente
COP	Coprostanol
DEs	Disruptores Endócrinos
DES	Dietilestilbestrol
DIE	Dienestrol
ERG	Ergosterol
ESTIG	Estigmasterol
E1	Estrona
E3	Estriol
Kow	Coeficiente de partição octanol-água
LD	Limite de Detecção
LQ	Limite de Quantificação
MeEE2	Mestranol
MMA	Ministério do Meio Ambiente
PI	Padrão Interno
PS	Padrão Surrogate
Si	$\beta$ -Sitosterol
UCs	Unidades de conservação
17 $\alpha$ -E2	17 $\alpha$ -Estradiol
17 $\beta$ -E2	17 $\beta$ -Estradiol
17 $\alpha$ -EE2	17 $\alpha$ -Ethinilestradiol

## SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	
2. OBJETIVOS .....	16
2.1 Objetivo geral .....	16
2.2 Objetivos específicos .....	16
3. REFERENCIAL TEÓRICO.....	17
3.1 Estuários .....	17
3.2 Unidades de conservação: Área de proteção ambiental .....	18
3.3 Marcadores moleculares .....	19
3.4 Esteróis .....	20
3.5 Disruptores endócrinos.....	22
4. ÁREA DE ESTUDO.....	24
5. MATERIAL E MÉTODOS.....	28
5.1 Amostragem .....	28
5.2 Procedimento de limpeza de vidraria .....	29
5.3 Preparo de amostra.....	29
5.4 Caracterização do sedimento.....	29
5.4.1 Análise granulométrica .....	29
5.4.2 Matéria Orgânica (MO).....	30
5.4.3 Ácidos Húmicos (AH) e Ácidos Fúlvicos (AF) .....	31
5.5 Determinação de Esteróis e Disruptores Endócrinos (DEs).....	33
5.5.1 Extração .....	33
5.5.2 Clean up (Limpeza do extrato da amostra) .....	35
5.5.3 Derivatização.....	36
5.5.4 Cromatografia.....	37
5.6 Controle de qualidade.....	39
5.6.1 Linearidade .....	39
5.6.2 Limite de Detecção (LD) e Quantificação (LQ).....	39
5.6.3 Padrão <i>surrogate</i> e padrão interno (PI) .....	41
6. RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	42
6.1 Caracterização do sedimento.....	42

6.1.1	Análise granulométrica .....	42
6.1.2	Matéria orgânica (MO).....	43
6.1.3	Ácidos Húmicos (AH) e Ácidos Fúlvicos (AF) .....	44
6.2	Concentração de Esteróis em sedimento superficial.....	45
6.3	Concentrações de Disruptores Endócrinos (DEs) em sedimento superficial. ....	50
6.4	Análise de Componentes Principais (ACP).....	53
6.5	Coeficiente de correlação não linear <i>Spearman</i> .....	55
7.	CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	56
	REFERÊNCIAS.....	57

## 1. INTRODUÇÃO

Os ecossistemas e as paisagens em todo o mundo tornaram-se cada vez mais domésticas devido à urbanização. As cidades têm sido propulsoras do desenvolvimento socioeconômico, mas também os centros de grandes problemas ambientais desde a revolução industrial. Os nossos ecossistemas e paisagens urbanas estão seguindo um caminho insustentável (WU, 2014).

No Brasil, a principal fonte de contaminação das águas deve-se aos esgotos domésticos não tratados, já que grande parte dos efluentes passa apenas pelo tratamento primário e a etapa de remoção de nutrientes e desinfecção não ocorre (SILVA; COLLINS, 2011). Este fato é preocupante já que nas zonas costeiras, o desenvolvimento social e econômico depende da disponibilidade de recursos hídricos para a água potável, a agricultura e a indústria (CHATTON *et al.*, 2016). Os efluentes urbanos e industriais que chegam aos rios acabam por desaguar em sistemas estuarinos e mangues (ARAÚJO, 2000).

Outra matriz importante que está sujeita a contaminação são os sedimentos. Seu uso é significativo na avaliação da contaminação dos ecossistemas aquáticos, pois eles acumulam elementos traços e são transportadores e possíveis fontes de contaminação. Além disso, eles podem disponibilizar os contaminantes devido a alterações nas condições ambientais e físico-químicas como: pH e ação microbiana afetando a qualidade da água, levando à bioacumulação e biomagnificação (COTTA; REZENDE; PIOVANI, 2006).

Os sedimentos representam um componente crucial do ambiente marinho, uma vez que constituem um habitat, um recurso trófico e um local de desova para vários organismos. Infelizmente, os sedimentos das áreas costeiras urbanas são profundamente degradados por atividades antropogênicas (KAPSIMALIS *et al.*, 2014).

Uma forma de degradação está relacionada a grande diversidade de contaminantes presentes nos ecossistemas costeiros, sendo importante relacioná-los com suas possíveis fontes e assim avaliar os impactos desses compostos procurando propor formas de mitigar o quadro encontrado e dar suporte ao cumprimento das legislações ambientais (MORAIS, 2014).

Uma forma de relacionar esses contaminantes com a sua fonte é a utilização de marcadores moleculares como, por exemplo, os esteróis que são



usados na identificação da origem da contaminação em diferentes compartimentos ambientais. Isto é possível devido à especificidade que eles possuem com as fontes. Além disso, outra característica desses compostos é a persistência em sedimentos e a resistência à degradação anaeróbica. Sendo a detecção dessas substâncias importantes por questões de saúde pública (CLARK 2001; VENKATESAN, 1992).

Assim como esteróis, existe também a identificação de disruptores endócrinos em matrizes ambientais, uma ação complementar no momento da avaliação da contaminação. Para se ter uma ideia, os excrementos humanos que compõe o esgoto representam uma fonte de contaminação por estrogênios (PESSOA, 2012).

Os compostos pertencentes a essas duas classes foram usados na avaliação da contaminação do complexo estuarino Timonha/Ubatuba. A região está localizada na divisa dos estados do Ceará e Piauí. Este estuário possui uma área de 10.184 hectares, uma das maiores áreas de manguezal do Nordeste do Brasil. Esse ecossistema é de importância ambiental para espécies de peixe-boi-marinho que o utilizam para alimentação, abrigo e reprodução, bem como é um local de parada de aves migratórias do Corredor Migratório do Atlântico Ocidental e área de desova e alimentação de tartarugas marinhas como: tartaruga de couro (Refúgio de Vida Silvestre Peixe-boi Marinho, 2008).

Essa área de grande relevância ambiental que abriga uma diversidade de seres vivos possui diversos impactos como: queimada do mangue para construção de salinas, ocupação desordenada do estuário, desmatamento das margens do rio, o que é considerada uma área de proteção permanente, implantação de fazendas de camarão, que causam desmatamento de vegetação de mangue, a impermeabilização do solo; e o lançamento de efluentes domiciliares e industriais o que altera as propriedades físico-químicas do sistema estuarino (Refúgio de Vida Silvestre Peixe-boi Marinho, 2008).

## **2. OBJETIVOS**

### **2.1 Objetivo geral**

Este trabalho tem como objetivo realizar uma análise ambiental da área de estudo em questão: Sistema estuarino Ubatuba/Timonha, utilizando como indicadores de contaminação os marcadores: esteróis e os disruptores endócrinos.

### **2.2 Objetivos específicos**

- Identificar e quantificar os esteróis e disruptores endócrinos nos sedimentos;
- Mensurar o grau de contaminação, através dos índices dos esteróis;
- Estimar a influência de fontes naturais e antrópicas;
- Caracterizar o sedimento quanto a granulometria, matéria orgânica, ácidos húmicos e ácidos fúlvicos.

### 3. REFERENCIAL TEÓRICO

#### 3.1 Estuários

Prichard (1967) definia estuários como um corpo de água costeiro semi-fechado que possui ligação livre com o mar aberto e que suas águas são mensuravelmente diluída pela água doce derivada de drenagem terrestre. Posteriormente Day (1980, 1981) modificando Pritchard (1967) formulou a seguinte definição: Um estuário é um corpo de água costeiro parcialmente fechado, que tenha permanentemente ou periodicamente ligação livre com o mar aberto e exista uma variação de salinidade devido à mistura de água do mar com água doce derivado da drenagem da terra.

Para Potter et al. (2010) estas definições caracterizam um estuário de regiões temperadas do hemisfério norte e não consideram as características de sistemas equatoriais e do hemisfério sul. Assim, propôs que um estuário é um corpo de água costeiro parcialmente fechado que está permanentemente ou periodicamente aberto ao mar e que recebe, pelo menos, descarga periódica de um rio, e assim, enquanto a sua salinidade é tipicamente menor que a da água do mar a variação pode ocorrer temporalmente e ao longo do seu comprimento, pode tornar-se hipersalino em regiões onde a perda de água por evaporação é alta e as entradas de água doce e maré são desprezíveis.

Esse ecossistema costeiro é uma zona de migrações entre espécies marinhas e estuarinas e proporciona suporte a esses animais como: alimentação, proteção e condições favoráveis para o crescimento e reprodução (BRAGA, 2000).

Os estuários sofrem mais com pressões induzidas pelo homem do que outros sistemas. Eles respondem as influências externas tanto naturais quanto antropogênicas (ELLIOTT; WHITFIELD, 2011). A poluição dos mangues, vegetação característica dos estuários, vem acontecendo com o aumento da urbanização e construção de viveiros para criação de camarão. O aumento populacional gera uma especulação imobiliária em regiões litorâneas e isso traz impactos a esses ambientes (SANTOS *et al.*, 2006)

Os impactos sobre os manguezais e conseqüentemente a fauna associada a ele pode diminuir em 10 vezes a biodiversidade de animais como: aves e peixes (CARABALLO, VALENCIA, 2000).

### **3.2 Unidades de conservação: Área de proteção ambiental**

O Ministério do Meio Ambiente (MMA) define unidades de conservação (UCs) como uma área que possui características naturais importantes. As UCs garantem que as comunidades tradicionais utilizem os recursos naturais de maneira racional e sustentável. Ainda de acordo com o MMA as UCs podem dividir-se em duas categorias: Unidades de Proteção Integral, que possuem regras mais restritas e em Unidades de Uso Sustentável que objetivam combinar a conservação com o uso sustentável dos recursos.

Dentre as Unidades de Uso Sustentável têm-se as Áreas de Proteção Ambiental (APA) que são espaços que possuem características naturais importantes para o bem-estar da população. Esta unidade geralmente é uma área extensa que visa proteger sua diversidade ecológica, ordenar as ocupações antrópicas e garantir a sustentabilidade no uso dos recursos.

O presente estudo tem sua área de trabalho inserida dentro de uma APA que foi criada a partir do Decreto de 28 de agosto de 1996 ao qual dispõe no seu artigo 1º:

Art. 1º Fica criada a Área de Proteção Ambiental (APA), denominada Delta do Parnaíba, localizada nos Municípios de Luís Corrêa, Morro da Mariana e Parnaíba, no Piauí; Araisos e Tutóia, no Maranhão; Chaval e Barroquinha, no Ceará, e nas águas jurisdicionais, com o objetivo de:

I - proteger os deltas dos rios Parnaíba, Timonha e Ubatuba, com sua fauna, flora e complexo dunar;

II - proteger remanescentes de mata aluvial;

III - proteger os recursos hídricos;

IV - melhorar a qualidade de vida das populações residentes, mediante orientação e disciplina das atividades econômicas locais;

V - fomentar o turismo ecológico e a educação ambiental;

VI - preservar as culturas e as tradições locais.

Conforme o Artigo 6º da Resolução nº 010 de 14 de dezembro de 1988 do Conselho Nacional do Meio Ambiente (CONAMA) “Não são permitidas nas APA's as atividades de terraplanagem, mineração, dragagem e escavação que venham a causar danos ou degradação do meio ambiente e/ou perigo para pessoas ou para a biota”.

### **3.3 Marcadores moleculares**

As características compartilhadas por marcadores moleculares são decorrentes do fato de suas estruturas estarem ligadas a uma origem específica. Assim, a observação de compostos no ambiente mostra a presença de uma fonte específica (EGANHOUSE, 1997).

Existem dois critérios principais que caracterizam um marcador molecular ideal, são eles: especificidade da fonte e comportamento conservador. A especificidade refere-se à ligação entre o marcador e uma determinada fonte, enquanto que o comportamento conservador é necessário, pois uma vez no ambiente os compostos sofrem influência de vários processos naturais. Esses processos podem ser físicos como o transporte por meio de advecção, sedimentação, mistura, ressuspensão e agregação, bem como transferências por volatilização, dissolução adsorção e dessorção. Alguns compostos podem estar sujeitos a reações fotolíticas seja na atmosfera ou em solução (EGANHOUSE, 1997).

Ao se utilizar um marcador para obter informações sobre a fonte, transporte ou concentrações de outros contaminantes, a similaridade ou diferença entre as propriedades físico-químicas do marcador molecular e o contaminante de interesse devem ser consideradas. Dentre as propriedades, a mais importante é a solubilidade, o que controla a concentração de um poluente em um ambiente aquático. Então, faz-se necessário conhecer o coeficiente de partição octanol-água (Kow) que representa o índice de hidrofobicidade dos compostos (TAKADA; EGANHOUSE; 1998).

Valores de  $\log Kow > 3$  indicam essa hidrofobicidade fazendo com que esses compostos sejam incorporados preferencialmente ao sedimento de fundo (GOMES, *et al.*, 2004).

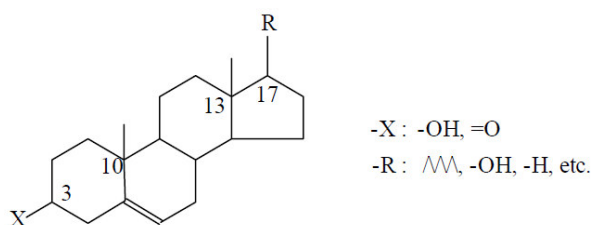
Os marcadores moleculares usados na avaliação da contaminação do sistema estuarino Ubatuba/Timonha foram os esteróis: Coprostanol (COP), esterol

fecal, Colesterol (COL), Colestanol (COLN), Ergosterol (ERG), Estigmasterol (EST) e  $\beta$ -Sitosterol (Si). Foram também usados disruptores endócrinos sintéticos: Dietilestilbestrol (DES), Dienestrol (DIE), Mestranol (MeEE2) e  $17\alpha$  – Etinilestradiol ( $17\alpha$ -EE2), bem como os naturais  $17\alpha$ -Estradiol ( $17\alpha$ -E2),  $17\beta$ -Estradiol ( $17\beta$ -E2), Estrona (E1), Estriol (E3).

### 3.4 Esteróis

Os esteróis são compostos que apresentam uma estrutura formada de 12 a 29 átomos de carbono, podendo ter grupos metílicos em particular nos carbonos 10 e 13 (LOURENÇO, 2003) (Figura 1).

Figura 1: Estrutura de um esterol.

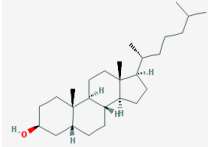
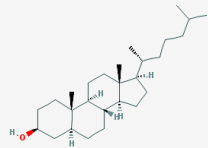
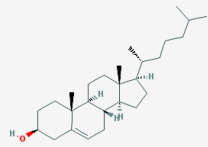
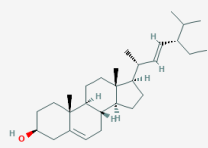
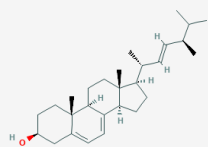
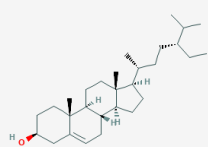


Fonte: LOURENÇO, 2003

Os esteróis tem uma boa especificidade com sua fonte e possuem resistência à degradação bacteriana. O coprostanol, esterol fecal, é gerado pela hidrogenação, ou seja, uma redução bacteriana do colesterol no intestino de animais superiores. Ele pode estar associado ao lançamento de efluentes domésticos. Organismos como: cianobactérias, microalgas, fitoplâncton e zooplâncton não produzem coprostanol (MARTINS *et al.*, 2007).

O colestanol é oriundo da redução química do colesterol, mas podem estar relacionados ao fitoplâncton como: diatomáceas e dinoflagelados. O colesterol não possui uma origem específica, já que pode estar presente em mamíferos de forma natural, bem como ser um subproduto da excreção de humanos. Ele é encontrado em grandes quantidades no fitoplâncton e zooplâncton. O ergosterol é originário de fungos decompositores. Já o estigmasterol e o  $\beta$ -sitosterol tem sua origem ligada a plantas terrestres superiores seja na composição de óleo vegetal, frutos ou sementes (VOLKMAN, 1986; GRIMALT, 1990; STEFENS, 2006). Algumas características dos esteróis presentes neste estudo estão dispostas na tabela 1.

Tabela 1: Características dos esteróis presentes nesse estudo.

Composto	Nome oficial (IUPAC)	Estrutura Molecular	Fórmula molecular	Log Kow
<b>Coprostanol</b>	5b-colestan-3b-ol		C <sub>27</sub> H <sub>48</sub> O	9,4
<b>Colestanol</b>	5a-colestan-3b-ol		C <sub>27</sub> H <sub>48</sub> O	9,4
<b>Colesterol</b>	colest-5-em-3b-ol		C <sub>27</sub> H <sub>46</sub> O	8,7
<b>Estigmasterol</b>	24-etilcolest-5,22(E)-dien-3b-ol		C <sub>29</sub> H <sub>48</sub> O	8,6
<b>Ergosterol</b>	Ergosta-5,7,22-trien-3β-ol		C <sub>28</sub> H <sub>44</sub> O	7,4
<b>β - sitosterol</b>	24 β -etil-colestan-5-en-3β-ol		C <sub>29</sub> H <sub>50</sub> O	9,3

Fonte: THE PUBCHEM PROJECT

Os sedimentos de um ambiente não contaminado por esgoto possui a presença de esteróis naturais como, por exemplo, Colesterol, Colestanol, Ergosterol, Estigmasterol e  $\beta$ - Sitosterol. Já quando estes sedimentos estão contaminados, existirá a presença de todos os esteróis citados anteriormente adicionado do Coprostanol, sendo este chamado de esterol fecal. Por não ter uma legislação que regule a concentração de coprostanol, faz-se necessário a comparação das concentrações deste composto com outros estudos e o uso de índices que relacionam o coprostanol com compostos como: colesterol e colestanol (LIMA, 2016). As razões utilizadas nesses índices estão listadas na tabela 2.

Tabela 2: Razões de diagnóstico entre o Coprostanol e outros esteróis.

Índices	Indicativo	Área contaminada	Área não contaminada	Referência
$COP/COL$	Contribuição de esgoto	> 1,0	< 1,0	MUDGE; BEBIANNO (1997)
$COP/COP + COLN$	Contaminação fecal humana	> 0,7	< 0,3	GRIMALT <i>et al.</i> (1990)
$COP/COLN$	Contaminação fecal humana	> 0,5	< 0,3	SHAH <i>et al.</i> (2007)
$COP/COLN + COL$	Contribuição de esgoto	> 0,2	< 0,15	CHAN <i>et al.</i> , (1998)

Fonte: LIMA (2016)

### 3.5 Disruptores endócrinos

Os disruptores endócrinos presentes nesse estudo são: disruptores endócrinos sintéticos Dietilestilbestrol (DES), Dienestrol (DIE), Mestranol (MeEE2) e  $17\alpha$  – Etilnilestradiol ( $17\alpha$ -EE2) e os naturais  $17\alpha$ -Estradiol ( $17\alpha$ -E2),  $17\beta$ -Estradiol ( $17\beta$ -E2), Estrona (E1), Estriol (E3). Algumas características desses compostos estão inseridas na tabela 3.

O termo disruptores endócrinos foi apresentado pela primeira vez em uma conferência organizada pela Dra. Theo Colborn, *The World Wildlife Fund* em 1991. O objetivo do encontro era discutir os efeitos dos contaminantes químicos sobre o

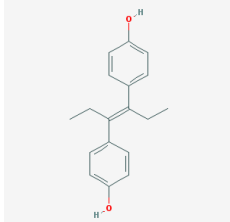
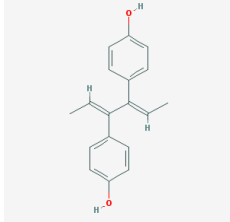
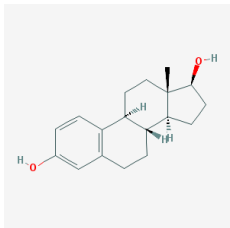


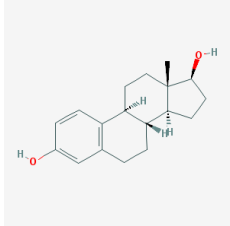
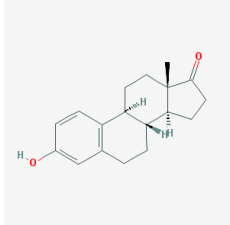
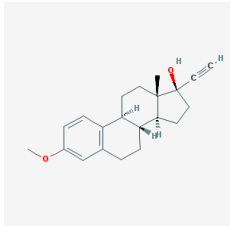
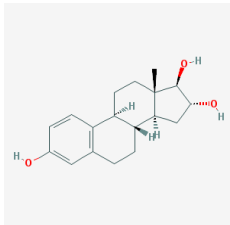
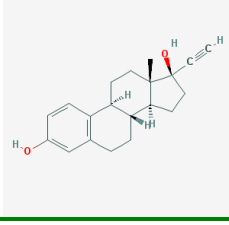
sistema endócrino de animais selvagens. Uma das razões para se preocupar foram às consequências do uso do Dietilestilbestrol (DES) para evitar abortos espontâneos. Os efeitos dessa ação eram: o câncer da vagina e infertilidade em filhas de mulheres que utilizaram dessa substância (OLEA et al, 2002).

As substâncias disruptoras são comumente persistentes no meio ambiente, elas concentram-se nos sedimentos e podem passar ao longo de uma cadeia trófica, podendo oferecer riscos aos animais e aos seres humanos (MEYER et al, 1999).

Em relação às propriedades físico-químicas desses compostos, pode-se observar que os estrógenos são hidrofóbicos. A sorção no sedimento pode ser um fator significativo na redução das concentrações em fase aquosa. Valores de log Kow dos estrógenos naturais são 2,81 para E3, 3,43 para E1 e 3,94 para E2. Já quando se trata de estrógenos sintéticos esses valores sobem para 4,15 para EE2 e 4,67 para mestranol (YING; KOOKANA; RU, 2002).

Tabela 3: Características dos disruptores endócrinos presentes nesse estudo.

Composto	Estrutura Molecular	Fórmula molecular	Log Kow
<b>Dietilestilbestrol</b>		C <sub>18</sub> H <sub>20</sub> O <sub>2</sub>	5,64
<b>Dienestrol</b>		C <sub>18</sub> H <sub>18</sub> O <sub>2</sub>	5,43
<b>17α – Estradiol</b>		C <sub>18</sub> H <sub>24</sub> O <sub>2</sub>	3,94
<b>17β – Estradiol</b>		C <sub>18</sub> H <sub>24</sub> O <sub>2</sub>	3,94

			
<b>Estrona</b>		$C_{18}H_{22}O_2$	3,43
<b>Mestranol</b>		$C_{21}H_{26}O_2$	4,67
<b>Estriol</b>		$C_{18}H_{24}O_3$	2,81
<b>17<math>\alpha</math>-Etinilestradiol</b>		$C_{20}H_{24}O_2$	4,15

Fonte: THE PUBCHEM PROJECT

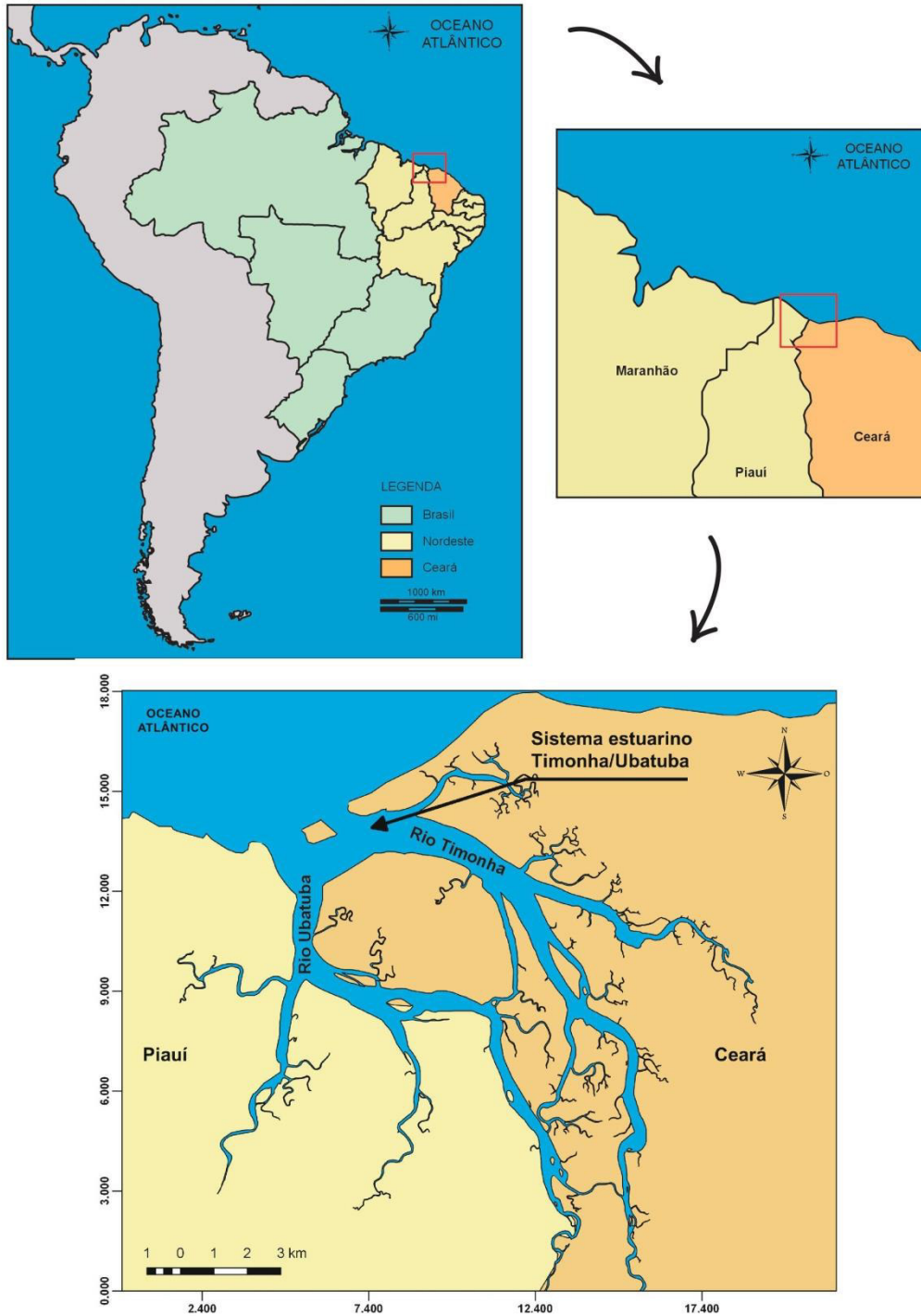
#### 4. ÁREA DE ESTUDO

O complexo estuarino dos rios Timonha-Ubatuba está localizado no noroeste do Estado do Ceará, aproximadamente 500 km de Fortaleza, fazendo limite com o Estado do Piauí (Figura 2). Ele abrange os municípios de Cajueiro da Praia, no Estado do Piauí, e os municípios Chaval e Barroquinha, no Ceará (DIAS, 2005).

No primeiro semestre do ano o fluxo de água doce é comandado pela precipitação. Já no segundo semestre, caracteristicamente estio, o fluxo do complexo estuarino é governado pelas oscilações diárias da maré. A ocorrência de bancos de areia e argila na desembocadura do estuário deu origem a Ilha Grande.

Esta ilha ajudou na união dos rios Timonha e Ubatuba por meio da evolução dos processos erosivos e alterações do nível do mar, bem como eventos de regressão e transgressão marinhas. A ilha Grande agiu como na deposição de sedimentos tanto provenientes das correntes marinhas quanto de origem fluvial (MEIRELES, 2010).

Figura 2: Localização da área de estudo.



Fonte: Autor

Estudos de batimetria no rio Timonha revelou que o sistema estuarino funciona como uma espécie de reservatório. A desembocadura é mais rasa que a parte interior o resultado é a diminuição da troca de água com o oceano. Antes de chegar à desembocadura o fluxo do rio é desviado para o rio Ubatuba devido a morfologia (DIAS, 2005).

O estuário do rio Timonha/Ubatuba tem sofrido alterações na sua dinâmica natural e isso se deve a implantação de salinas e fazendas de camarões, além da ocupação de áreas de praia e manguezal (CAMPOS *et al.*, 2016). Análises de imagens de satélites sugerem que a perda de áreas de mangue está associada principalmente a carcinicultura, dado o período recente das mudanças (MAIA *et al.*, 2005). A importância da região consiste em ser um berçário para peixe-boi marinho, cavalos-marinhos, inúmeras espécies de peixes, crustáceos e moluscos (CAMPOS *et al.*, 2016).

O município de Chaval, que está ao entorno do sistema estuarino possui uma população de 12.615 habitantes (IBGE, 2010) com população estimada de 12.931 para o ano de 2016. Desse total. 9.168 residem na área urbana e isto representa 72,68 % da população, enquanto que 27,32 % moram na zona rural, 3.447 pessoas. Seu clima característico é o tropical quente semiárido brando, a região possui uma pluviosidade anual de 1081,2 mm com temperaturas médias variando de 26 a 28 °C e estando seu período chuvoso localizado nos meses de janeiro a maio (IPECE, 2016).

De acordo com o Perfil Básico Municipal de Chaval, a taxa de cobertura urbana de esgoto para o estado do Ceará é de 38,24%, dados estes disponibilizados pela CAGECE e referentes ao ano de 2015. Levando em consideração os domicílios particulares permanente, de um total de 3.201 casas, 0,91 % possuíam rede geral ou pluvial como tipo de esgotamento sanitário; 6,21% eram de fossa séptica; 70,48% incluídos na opção "outra" e 22,31 %, ou seja, 714 residências, não tinham banheiros. Em relação a coleta de lixo, 63,11% das residências tinham seu lixo recolhido (IBGE 2010).

O município de Barroquinha tem seus aspectos climáticos semelhantes a Chaval, apenas diferindo no nível de pluviosidade anual com 1164,4 mm. Residem nesta cidade 14.476 pessoas, com estimativa de 14.854 para o ano de 2016 (IBGE, 2010). Nessa região, 31,71 % possui esgotamento sanitário. Quando observado o

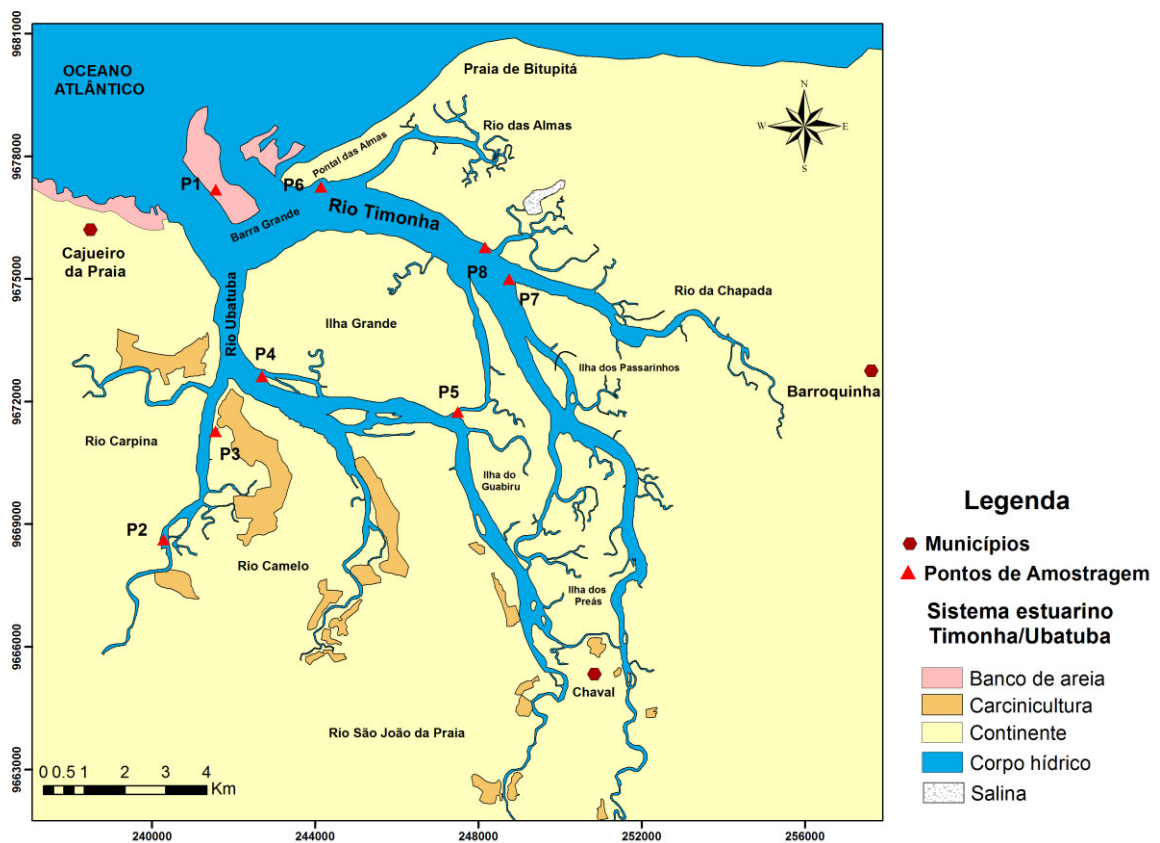
tipo de esgotamento sabe-se que das 3.682 residências, 335 (9,10 %) possuem rede geral ou pluvial, 453 (12,30 %) fossa sépticas, 2.235 (60,70 %) outro tipo de esgotamento e 659 (17,90 %) não possuem banheiros. Em Barroquinha, aproximadamente a metade das casas, 51,36 %, tem o lixo residencial coletado.

## 5. MATERIAL E MÉTODOS

### 5.1 Amostragem

Foi realizada uma coleta de sedimentos superficiais (2 cm de profundidade) em junho de 2014 ao longo dos rios Timonha e Ubatuba chegando, por fim no sistema estuarino composto por eles. Ao total foram 8 pontos coletados com auxílio de uma embarcação, os pontos amostrados estão representados no mapa da figura 3. O material coletado foi armazenado em embalagens de alumínio e transportados refrigerados até o Laboratório de Avaliação de Contaminantes Orgânicos (LACOr) do Instituto de Ciências do Mar - LABOMAR da Universidade Federal do Ceará (UFC).

Figura 3: Localização dos pontos de amostragem



Fonte: Autor

## **5.2 Procedimento de limpeza de vidraria**

A limpeza do material utilizado seguiu o protocolo de operação padrão desenvolvido pelo laboratório. Toda a vidraria usada nos procedimentos experimentais realizados foi lavada com detergente Extran 5% v/v e submerso em banho do mesmo detergente, só que agora em concentração de 20% v/v por um período de 24 h. Logo após, foram enxaguadas em água corrente e imersas em banho de ácido nítrico 5% v/v por 24 h. Ao final desta etapa as vidrarias foram enxaguadas novamente e secas em estufa a 60 °C.

## **5.3 Preparo de amostra**

Com o intuito de caracterizar o sedimento através da sua granulometria, foi separado porções de 100 g de sedimentos para serem secas na estufa (Medicate MD 12) a 65 °C graus. Já com o objetivo de caracterizar o material, dessa vez pelo seu teor de matéria orgânica, carbono orgânico, ácidos Húmicos, ácidos Fúlvicos e extrair os possíveis contaminantes desse compartimento ambiental, foi seca uma segunda porção da amostra por meio de liofilização (Liofilizador Liotop modelo L101), para assim garantir que as características químicas das amostras fossem mantidas, uma vez que a secagem por temperaturas elevadas podem degradá-las.

## **5.4 Caracterização do sedimento**

### **5.4.1 Análise granulométrica**

A análise granulométrica foi executada por meio das seguintes etapas: secagem inicial e quarteamento, peneiramento úmido, pipetagem e peneiramento seco.

Para secagem inicial a amostra foi levada a estufa a 60 °C, logo após ela foi macerada com o auxílio de um pistilo e, então houve a homogeneização por meio do quarteamento que consiste em separar a amostra em quatro partes e juntar as partes opostas até que se tenha novamente uma única fração. Reservou-se 100 g da amostra homogeneizada.

Na etapa de peneiramento úmido a amostra é lavada em uma peneira de malha 0,062 mm até o ponto que a água que passou pela peneira não esteja mais turva. A água da lavagem é armazenada em um recipiente e o material retido na peneira foi encaminhado para estufa a 65 °C.

Na etapa de pipetagem o excesso de água da lavagem é sifonado com o cuidado de não perturbar os sedimentos que decantaram ao fundo. Logo após o sedimento foi transferido para uma proveta de 1000 mL e adicionado 0,67 g de oxalato de sódio para evitar a floculação.

O volume da proveta foi, então, completado com água destilada e houve a mistura desse sistema com o auxílio de um bastão de vidro até que o reagente fosse dissolvido por completo. Foram coletadas 20 ml da solução no nível de 20 cm abaixo da cota de 1000 mL da proveta nos tempos de 0:00'58" e 0:03'52" e 20 ml da solução dessa vez no nível de 10 cm nos tempos 0:07'44", 0:31'00" e 2:03'00". Cada coleta foi recolhida em um béquer e este foi levado a estufa.

O peso do sedimento foi determinado pela diferença entre o peso do béquer seco e com sedimento seco. Por fim, o peneiramento seco foi realizado utilizando a fração retida na peneira de 0,062 mm. Este material foi passado por um conjunto de peneiras movimentadas por um agitador eletromagnético (Bertel) durante 10 min. O sedimento retido em cada peneira foi pesado (SUGUIO, 1973). Todos os valores obtidos foram tratados utilizando o programa ANASED.

#### **5.4.2 Matéria Orgânica (MO)**

O teor de matéria orgânica do sedimento foi determinado através de valores de carbono orgânico e para isso seguiu-se a metodologia proposta por Walkley-Black com pequenas modificações (Camargo *et al.*, 2009).

O método baseia-se na oxidação da matéria orgânica do sedimento com dicromato de potássio ( $K_2Cr_2O_7$ ) em presença do ácido sulfúrico ( $H_2SO_4$ ), tendo como catalizador da oxirredução o calor liberado na diluição do ácido e titulação do excesso de dicromato com o sulfato ferroso amoniacal (SFA –  $FeSO_4(NH_4)_2SO_4 \cdot 6 H_2O$ ).

O carbono orgânico é obtido através da equação 1:

$$\%C = \frac{[10 - (\frac{V_2 \times 10}{V_1})] \times 0,4}{p} \quad (1)$$



Em que:

V1: volume de SFA gasto na titulação do branco (mL);

V2: volume de SFA gasto na titulação da amostra (mL);

p: peso da amostra (g).

Para a obtenção dos valores de matéria orgânica utiliza-se a equação 2:

$$\%MO = \%C \times 1,725 \quad (2)$$

Em que:

%C: é a porcentagem de carbono orgânico determinado em um 1 g de sedimento.

#### **5.4.3 Ácidos Húmicos (AH) e Ácidos Fúlvicos (AF)**

Para fazer esta análise é necessário se ter o conhecimento do valor de carbono orgânico total (COT) presente no sedimento, já que na realização deste procedimento pesa-se uma amostra de sedimento que contenha 30 mg de COT.

Seguindo a metodologia de Benites, Madari e Machado (2003), o sedimento é transferido para um tubo de falcon de 50 mL e adicionado a ele 20 mL de NaOH 0,1 mol L<sup>-1</sup> e deixado em repouso por 24 h. Passado o tempo, os tubos são inseridos na centrífuga a 5000 rpm por 30 min. Após este tempo no aparelho, os tubos são retirados e o sobrenadante coletado, transferindo-o para copos plásticos descartáveis de 50 mL.

Adicionou-se, então, mais 20 mL de NaOH 0,1 mol L<sup>-1</sup> a cada amostra agitando manualmente a solução para desprender e ressuspender o precipitado. Esta nova solução ficou em repouso por 1 h. Em seguida, retornou a centrífuga nas mesmas condições. Ao término, recolheu-se o novo precipitado reservando-o no mesmo copo plástico. O pH do sobrenadante foi ajustado para 1 com a adição de uma solução de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 20% e deixado decantando por 18 h. Este então foi filtrado em filtro de membrana de 0,45 µm. Em seguida o filtrado (o que passa pela membrana de 45 µm) foi aferido para um volume de 50 mL usando água destilada o que corresponde a fração de ácidos fúlvicos. Já o que foi retido na membrana de 45 µm foi lavado com NaOH 0,1 mol L<sup>-1</sup> até seu total desprendimento e aferido para

um volume de 50 mL utilizando, também, água destilada. Este corresponde a fração de ácidos húmicos.

Deu-se seguimento no procedimento transferindo um alíquota de 5 mL da solução de ácido húmico ou fúlvico ou água destilada ( para 4 brancos) para tubos de digestão com o auxílio de uma pipeta automática e adicionou-se 1 mL de  $K_2CR_2O_7$  0,042 mol L<sup>-1</sup> e com a pipeta volumétrica, 5 mL de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> concentrado.

Os tubos com as amostras e dois dos quatros brancos foram colocados em bloco digestor pré-aquecido a 150 °C e permaneceu por um período de 30 min. Este procedimento foi realizado dentro de uma capela. Após este tempo, a solução dos tubos de digestão foi transferida para Erlemeyer de 125 mL para adição de 3 gotas de indicador Ferroin e, então, deu-se inicio ao processo de titulação com sulfato ferroso amoniacal 0,0125 mol L<sup>-1</sup>.

A quantificação dos ácidos húmicos ou fúlvicos foi obtida através da equação 3:

$$X = \frac{(V_{baq} - V_{am}) N_{SFAcorr} \times 12 \times 50}{4 \times \text{peso da amostra} \times \text{alíquota (ml)}} \quad (3)$$

Em que:

X - mg C na forma de ácido húmico (ou fúlvico) por grama de solo

V<sub>baq</sub> - Volume (mL) de SFA consumido na titulação do branco aquecido

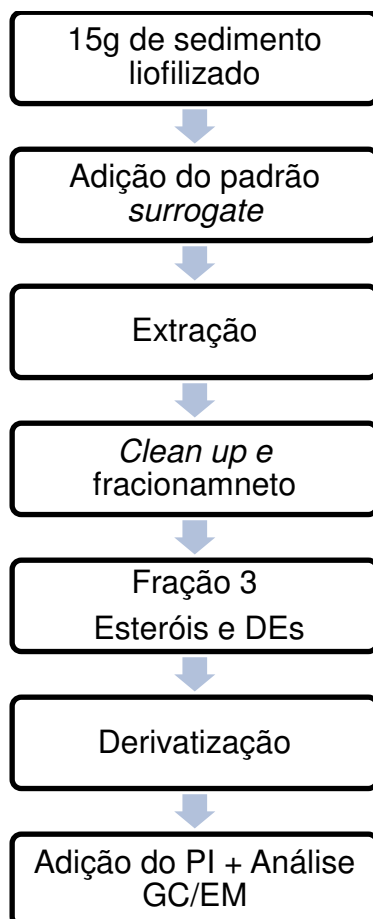
V<sub>am</sub> - Volume (mL) de SFA consumido na titulação da amostra

N<sub>SFAcorr</sub> - Normalidade do SFA corrigida pela equação 4:

$$N_{SFAcorr} = \frac{\text{Volume de dicromato} \times \text{Normalidade do dicromato}}{\text{Volume de SFA consumido na titulação do branco sem aquecimento}} \quad (4)$$

## 5.5 Determinação de Esteróis e Disruptores Endócrinos (DEs)

Figura 4: Fluxograma das etapas seguidas para a determinação dos compostos.



Fonte: Autor

### 5.5.1 Extração

A extração e o *clean up* dos compostos estudados foi baseada na metodologia proposta por Cavalcante *et al.* (2008), com pequenas modificações. A extração sólido-líquido foi feita a partir de 15 g de sedimento previamente liofilizado, em que foi adicionado 5000 ppb de padrão *surrogate*. A seguir foram adicionados diferentes solventes de acordo com a Tabela 4. Cada mistura permaneceu 20 min no banho de ultrassom (ELMASONIC modelo E 120 H).

Tabela 4: Misturas de solventes usados na etapa de extração

Misturas de solventes	Tempo
30 mL de acetona	20 min
30 mL de acetona e acetato de etila (1:1 v/v)	
30 mL acetato de etila	20 min
30 mL de acetato de etila e diclorometano (DCM) (1:1 v/v)	
30 mL de DCM	20 min
30 mL de DCM e hexano (1:1 v/v)	20 min
30 mL de hexano.	20 min

Fonte: Autor

Ao término desse processo a amostra foi centrifugada durante 15 min com uma rotação de 4000 rpm (centrífuga HermLe modelo Z 360 K) com a intenção de separar o sedimento da mistura de solventes extratora. Então, o sobrenadante foi recolhido e pré-concentrado a 1mL a partir de um rotaevaporador FISATOM 801 (Figura 5).

Figura 5: Equipamentos usados na extração: a) Rotaevaporador, b) Banho Ultrasom e c) Centrífuga.



Fonte: Duaví (2013)

### 5.5.2 Clean up (Limpeza do extrato da amostra)

Este procedimento consiste na passagem do pré-concentrado de 1 mL obtido na etapa de extração por uma coluna de cromatografia de adsorção composta por: sílica, alumina, cobre e sulfato embebidos em hexano tendo em sua base lã de vidro. A sílica e a alumina foram ativadas em estufa a 200 °C por 12 h, já o sulfato permaneceu apenas 2 h nesta mesma temperatura. No caso do cobre a ativação deu-se através da sua lavagem com 40 mL de ácido clorídrico 0,1M, neste processo aguardou-se o cobre decantar e sifonou-se o ácido. Em seguida o mesmo foi feito utilizando-se para 40 mL de acetona, armazenando o cobre ao final em 40 mL de hexano.

Para montagem dessa coluna adicionou-se a uma bureta 10 g de sílica gel (70-230 mesh, marca MERK), 4 g de alumina (MERK) previamente ativados em estufa (24h/250°C) e com o auxílio da graduação da vidraria, 0,5 cm de cobre ativado em HCl (0.1M) e 2 cm de sulfato de sódio (VETEC). Finalizado esse processo, adicionou-se a amostra e, em seguida, iniciou-se a adição de misturas de solventes com o intuito de particionar a amostra em 3 frações como descrito na tabela 5. Estas frações eram recolhidas em balões e concentradas a 1mL com o auxílio de um rotaevaporador. Para este estudo foi utilizado somente a Fração de número 3.

Tabela 5: Frações extraídas na etapa de *clean up*

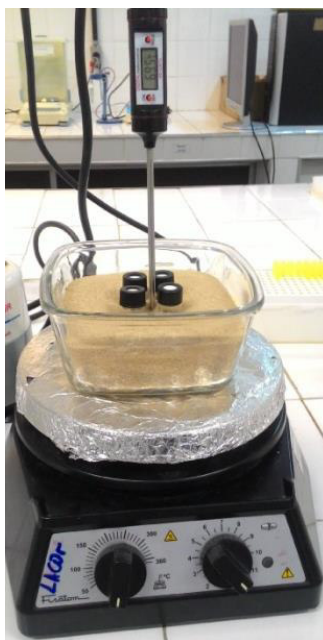
Fração N°:	Misturas de Solventes	Compostos extraídos
1	40 ml de hexano	Hidrocarbonetos Alifáticos (HAs) e alquibenzendos lineares (LABs)
2	30 ml de hexano e diclorometano (3:1)	Hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs)
3	50 ml de diclorometano e metanol (3:1)	Esteróis e Disruptores endócrinos

Fonte: Autor

### 5.5.3 Derivatização

O processo de derivatização faz-se necessário na análise desses compostos em cromatografia a gás, pois eles são pouco voláteis tendo sua detecção dificultada. Assim, com o intuito de aumentar essa volatilidade e conseqüentemente melhorar a análise cromatográfica, os compostos são convertidos em ésteres trimetil-silícicos por meio da substituição do hidrogênio da hidroxila da posição 3 dos esteróis pelo grupo trimetil-silícico do reagente utilizado: N, O-bis (trimetil-silil-trifluoracetamida) /trimetil-cloro-silano (BSTFA/TMCS 9:1). A derivatização foi realizada levando as amostras a secura através de fluxo de gás de nitrogênio  $N_2$  (g) e em seguida adicionado 50  $\mu$ L de BSTFA/TMCS e aquecendo essa solução em banho de areia (Figura 6) a 65 °C durante 90 min. Logo após a solução foi novamente seca com  $N_2$  (g) e os compostos ressuspensos em com 500  $\mu$ L de acetonitrila/metanol (1:1 v/v).

Figura 6: Amostras em banho de areia; termômetro para o melhor controle da temperatura.



Fonte: Autor

#### 5.5.4 Cromatografia

Para detecção dos compostos estudados foi utilizado um cromatógrafo gasoso acoplado a um espectrômetro de massa (CG-EM), da marca Shimadzu, modelo QP2010 (Figura 7) com coluna capilar DB-5 (5% Difenil – 95% Dimetil Polisiloxano) com 30 m de comprimento, 0,25 mm de diâmetro interno e 0,25 µm espessura de filme.

Figura 7: Cromatógrafo gasoso acoplado a um espectrômetro de massa (CG-EM)



Fonte: Autor

As condições cromatográficas do equipamento no momento da injeção eram:

- ✓ Gás de arraste (fase móvel) – Hélio
- ✓ Modo de injeção: Splitless
- ✓ Modo de detecção: SIM
- ✓ Pressão na coluna – 145,2 kPa
- ✓ Temperatura do injetor - 260 °C
- ✓ Temperatura do detector - 260 °C
- ✓ Temperatura final – 300°C
- ✓ Temperatura inicial – 100°C
- ✓ Vazão total – 25 mL min<sup>-1</sup>
- ✓ Vazão na coluna – 2 mL/min
- ✓ Volume de injeção: 2 µL

O tempo de corrida era de 27 min., estando à temperatura inicial a 100 °C esta foi mantida por um período de 10 min até que se elevou para 300°C a uma taxa de variação de 20 °C/min onde se estabilizou por 7 min, concluindo o tempo de corrida total.

Os compostos analisados, padrão interno e *surrogate* foram identificados nos cromatogramas através dos seus respectivos tempos de retenção e relações massa/carga (m/z) dos principais fragmentos moleculares. Estes estão listados na Tabela 6.

Tabela 6: Tempos de retenção e razões massa/carga (m/z)

Compostos	Tempo de Retenção (TR) min.	Relação massa/carga (m/z)
Diethylstilbestrol (DES)	19,191	145 / 107 / 268
Dinestrol (DIE)	19,269	73 / 266 / 121
17 α-Estradiol (17 α - E2)	20,421	73 / 159 / 146
17 β-Estradiol (17 β - E2)	20,430	73 / 129 / 160
Estrona (E1)	20,471	73 / 257 / 342
Estrona 2,4 d2 (E1 - d2) <i>surrogate</i> PS	20,492	147 / 159 / 160
Mestranol (MeEE2)	20,612	227 / 147 / 174
Estriol (E3)	20,738	73 / 285 / 129
17 α – Etillestadiol (EE2)	20,914	213 / 73 / 285
5α-colestano – Padrão Interno (PI)	21,543	81 / 95 / 149
Coprostanol (COP)	22,731	75 / 95 / 107
Colesterol (COL)	23,336	73 / 95 / 81
Colestanol (COLN)	23,466	75 / 95 / 81
Ergosterol (ERG)	24,631	81 / 55 / 69
Estigmasterol (EST)	24,997	83 / 55 / 81
β-Sitosterol (Si)	25,118	73 / 95 / 57

Fonte: Autor



## 5.6 Controle de qualidade

### 5.6.1 Linearidade

Uma relação linear deve ser usada em todo processo analítico, este procedimento é capaz de obter resultados de um teste que seja diretamente, ou através de uma transformação matemática bem definida, proporcional à concentração do analito em amostras dentro de uma faixa de trabalho.

A Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) recomenda que a linearidade seja determinada pela análise de, no mínimo, 5 concentrações. Para este trabalho foi estipulada este valor mínimo e ele variou entre 50 e 10000 ug.L<sup>-1</sup>. Os parâmetros de qualidade estão apresentados na tabela 7.

### 5.6.2 Limite de Detecção (LD) e Quantificação (LQ)

O limite de detecção (LD) é a menor quantidade do analito presente em uma determinada amostra que pode ser detectado, mas nem sempre quantificado. Tratando-se de métodos instrumentais como o CG, este limite pode ser calculado utilizando da relação de 3 vezes o ruído da linha de base (ANVISA, 2003). Sendo assim, ele foi determinado pela equação 5:

$$LD = 3 \times \frac{DP}{S} \quad (5)$$

Em que:

DP: desvio padrão dos brancos.

S: Coeficiente angular da equação da reta.

O limite de quantificação (LQ) é a menor quantidade do analito que pode ser determinada com precisão e exatidão em um processo experimental (ANVISA, 2003). Este foi calculado através da equação 6:

$$LQ = 10 \times \frac{DP}{S} \quad (6)$$

Tabela 7: Controle de qualidade dos dados.

Composto	Equação	Coefficiente de correlação R	LD (µg/L)	LQ (µg/L)
Dietilestilbestrol (DES)	$y = 0,0001x + 0,0081$	0,9910	36,64	122,12
Dinestrol (DIE)	$y = 0,0015x + 0,0226$	0,9940	6,20	20,66
17 α-Estradiol (17α-E2)	$y = 0,0004x + 0,0088$	0,9989	10,01	33,36
17 β-Estradiol (17β-E2)	$y = 0,0009x + 0,0075$	0,9993	15,58	51,93
Estrona (E1)	$y = 0,0006x + 0,0131$	0,9933	41,66	138,87
Mestranol (MeEE2)	$y = 0,0003x + 0,0035$	0,9980	21,93	73,09
Estriol 1 (E3)	$y = 0,001x + 0,0285$	0,9998	68,94	229,80
17α - Etinilestradiol (17α - EE2)	$y = 0,0005x + 0,0034$	0,9993	24,47	81,55
Coprostanol (COP)	$y = 0,0016x + 0,0629$	0,9992	9,12	30,40
Colesterol (COL)	$y = 0,0013x + 0,0458$	0,9972	16,57	55,24
Colestanol (COLN)	$y = 0,0014x + 0,0552$	0,9982	38,26	127,55
Ergosterol (ERG)	$y = 0,0008x + 0,0094$	0,9921	12,65	42,16
Estigmasterol (EST)	$y = 0,0001x + 0,0219$	0,9993	10,19	33,98
β-Sitosterol (Si)	$y = 0,0008x + 0,0094$	0,9996	23,45	78,17

Fonte: Autor

### 5.6.3 Padrão *surrogate* e padrão interno (PI)

Uma das fases do controle de qualidade foi realizada a partir do uso de padrão *surrogate* (PS) (estrona- 2,4 d<sub>2</sub>). As amostras foram dopadas com concentração de 5000 ppb desse padrão antes de dar-se o início das extrações. O PS avalia a eficiência do processo das amostras. Já para corrigir os possíveis erros na análise cromatográfica foi usado o padrão interno (5 $\alpha$ -colestano) na concentração de 1000 ppb, as amostras e curva foram dopadas com esse padrão antes das injeções no CG/ES. Neste trabalho a recuperação de PS foi de 63,5 %, não existindo um valor de recuperação padrão para sedimento (MORAIS, 2014).

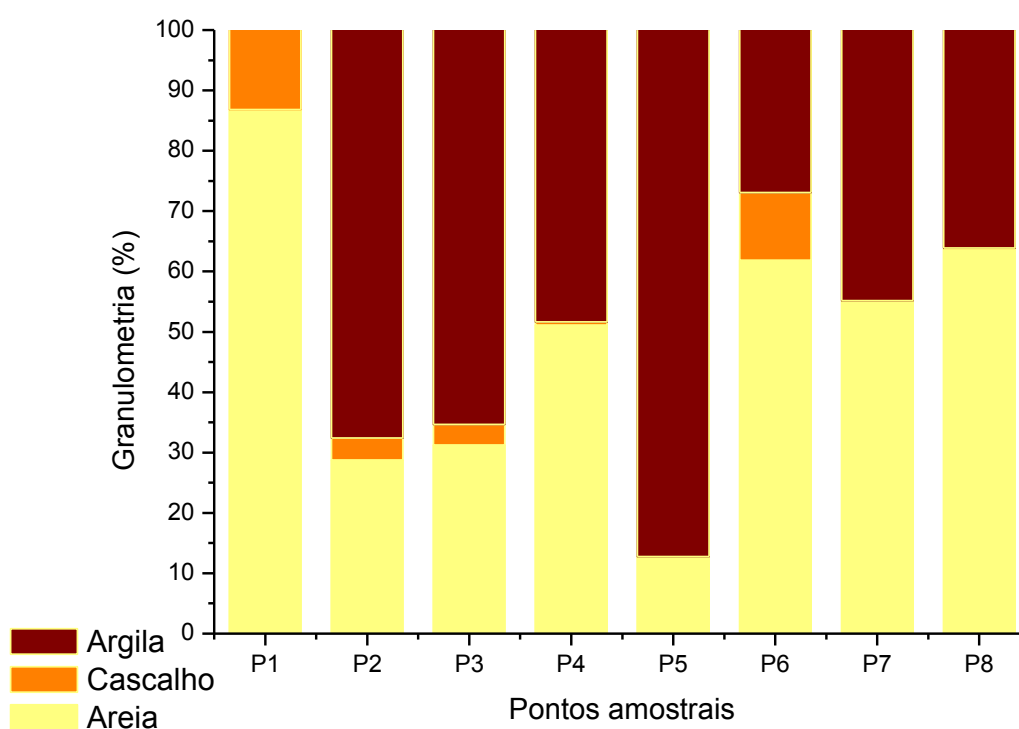
## 6. RESULTADOS E DISCUSSÕES

### 6.1 Caracterização do sedimento

#### 6.1.1 Análise granulométrica

A granulometria dos sedimentos presentes no sistema estuarino Ubatuba/Timonha estão apresentadas no Gráfico 1.

Gráfico 1: Percentual de argila, cascalho e areia nas amostras sedimentares.



Fonte: Autor

Verifica-se através dos dados de granulometria que o estuário possui sedimentos com percentuais de argila em diferentes níveis, exceto o P1 onde não há fração de argila e em que existe a predominância de areia (86,81%) e isto se deve ao fato do P1 ser o ponto de maior influência marinha e está localizado na barra do estuário próximo a um banco de areia. O ponto P5 possui um maior percentual de argila, 87,21%, sendo classificado de acordo com Sheppard (1954) como lama.

A classificação da granulometria está apresentada na Tabela 8. Houve uma predominância da fração areia e o mesmo foi observado por Dias (2005) em trabalhos na região; bem como a presença de sedimentos finos.

Tabela 8: Classificação granulométrica das amostras de sedimento

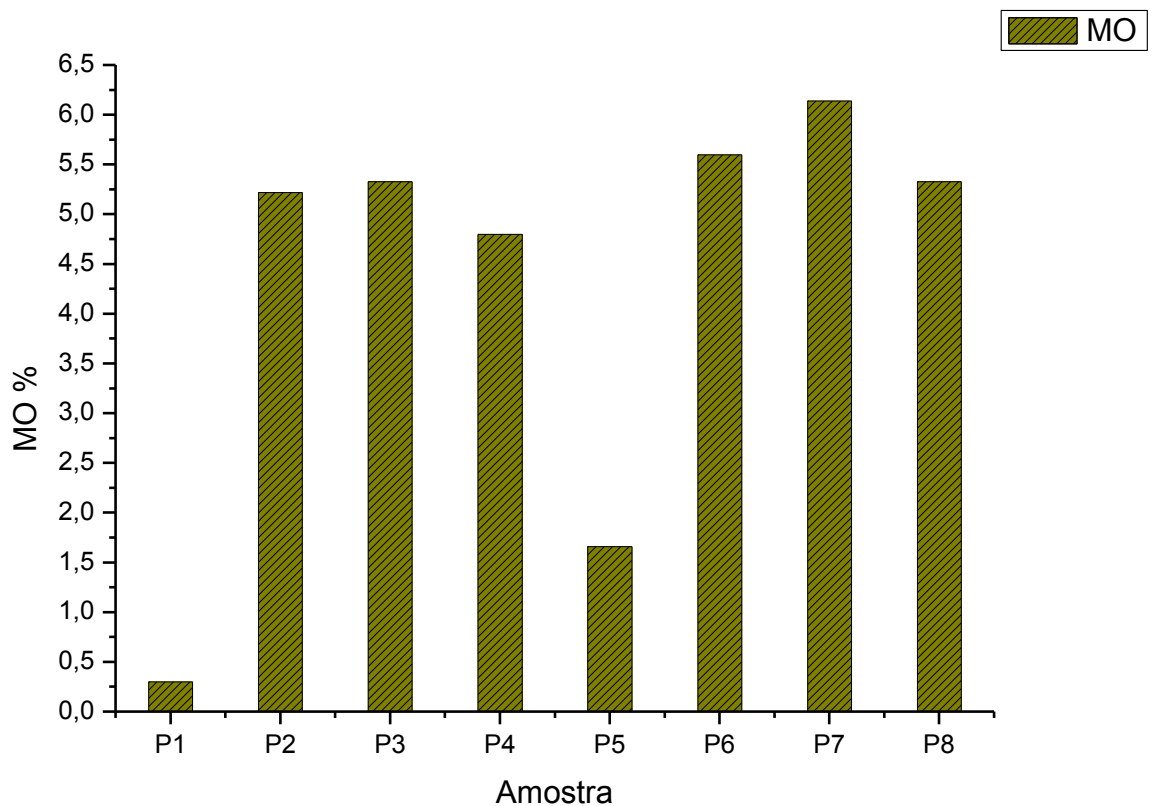
Amostra	Classificação Sheppard (1954)
P1	Areia
P2	Lama Arenosa
P3	Lama Arenosa
P4	Areia Lamosa
P5	Lama
P6	Areia Lamosa
P7	Areia Lamosa
P8	Areia Lamosa

Fonte: Autor.

### 6.1.2 Matéria orgânica (MO)

Os percentuais de matéria orgânica nos sedimentos da área de estudo estão expostos no Gráfico 2. Valores máximos de MO (6,14 %) são encontrados no P7 e o menor percentual (0,30 %) é verificado no P1. Com intuito de caracterizar a cobertura sedimentar utilizando como um dos parâmetros a matéria orgânica Dias (2005) encontrou baixos teores de MO sendo a máxima porcentagem registrada de 5%.

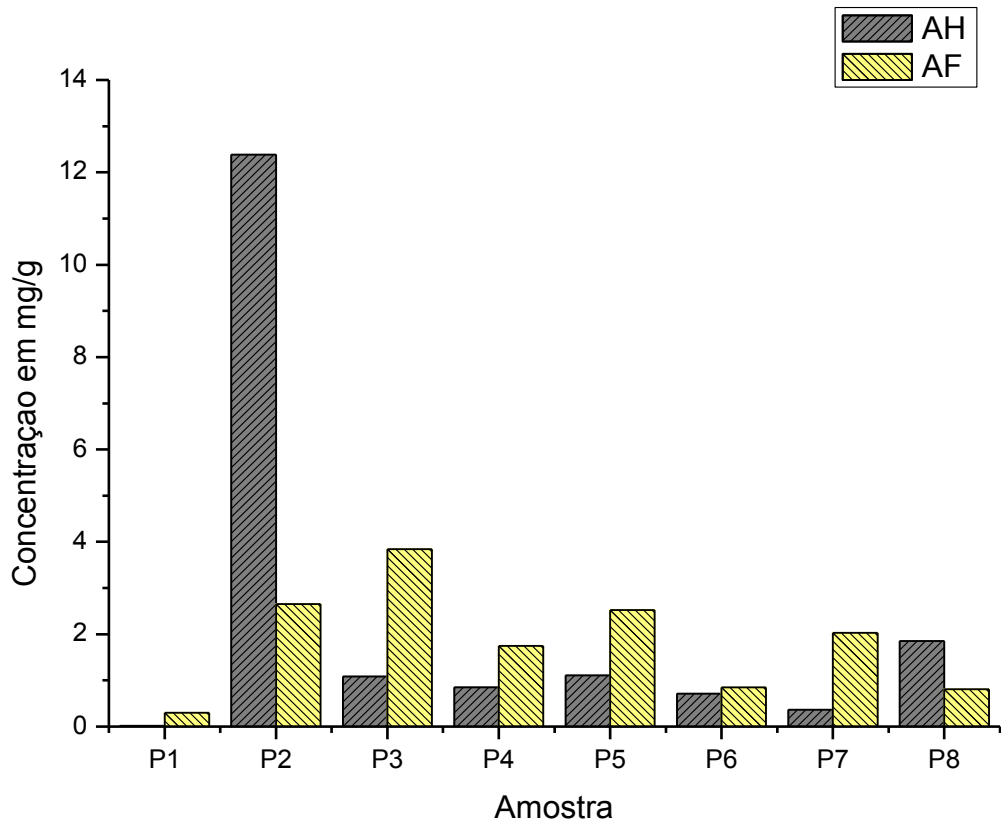
Gráfico 2: Teor de MO em sedimento.



### 6.1.3 Ácidos Húmicos (AH) e Ácidos Fúlvicos (AF)

Ácidos húmicos (AH) e Ácidos Fúlvicos (AF) são uma importante fração dissolvida, pois possuem a capacidade de reter compostos orgânicos hidrofóbicos (MANSUY *et al.*, 2001). A matéria orgânica é composta por substâncias húmicas: AH e AF. Elas são consideradas representativas da fração leve absorvente do MO em ambientes aquáticos e são conhecidas por impedirem a transformação dos compostos por filtragem da luz solar (Carlos *et al.*, 2012). As concentrações de AF e AH encontradas nas amostras de sedimento analisadas estão presentes no Gráfico 3.

Gráfico 3: Porcentagem de AH e AF em sedimento.



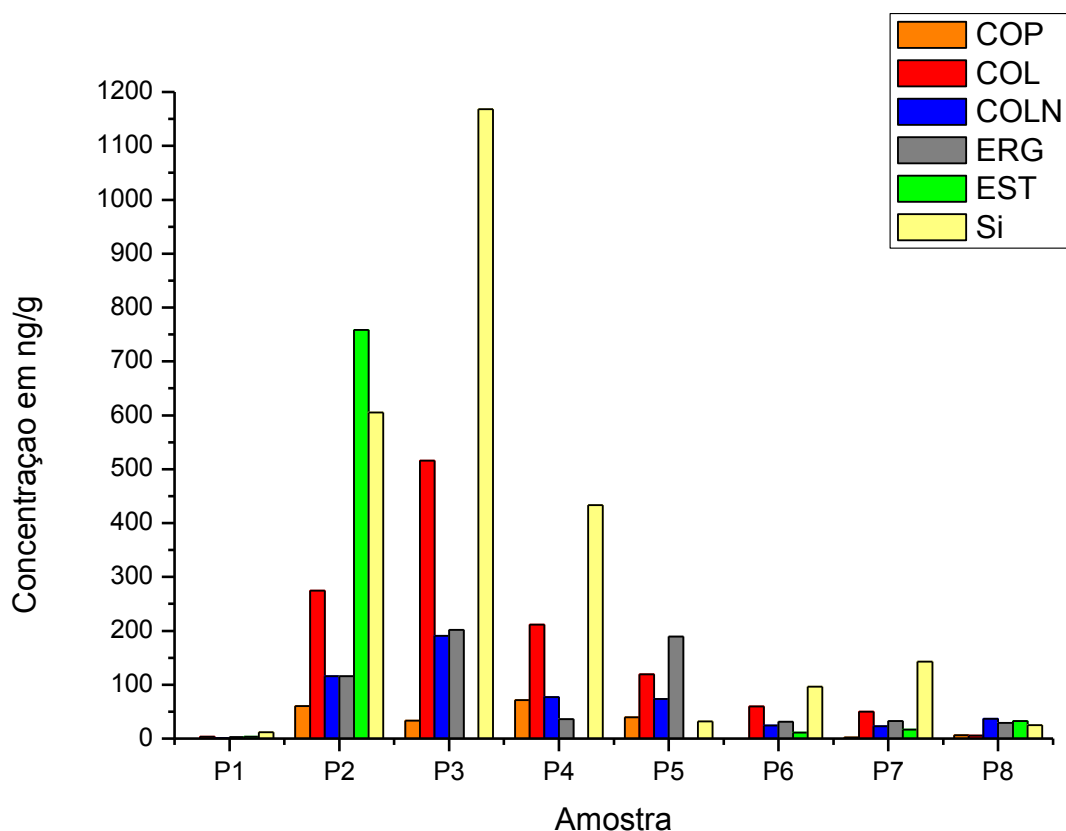
Fonte: Autor.

## 6.2 Concentração de Esteróis em sedimento superficial

As concentrações dos esteróis que foram quantificadas com a análise dos cromatogramas estão ilustradas no gráfico 4.

Ao se observar o somatório de esteróis estudados: COP, COL, COLN, ERG, EST e Si por ponto, houve uma variação de 3,85 (P1) – 351,62 ng/g (P3).

**Gráfico 4:** Concentrações de Esteróis em sedimento.



Fonte: Autor

O  $\beta$ -Sitosterol (Si) dentre os esteróis foi o que obteve níveis mais expressivos que chegaram até 1168,33 ng/g (P3) esse composto é oriundo de plantas vasculares ou algas (CARREIRA et al., 2002). A região estudada trata-se de uma área de manguezal o que justifica a entrada desses compostos no ambiente. Em trabalhos de MORAIS (2014) e LIMA (2016) o  $\beta$ -Sitosterol foi também o esteroide mais abundante nas amostras de sedimento sendo justificado pela entrada de plantas superiores, já que sua produção está ligada a esses vegetais.

O EST nos pontos: P3, P4 e P5 não foi detectado e teve valores variando de 3,04 ng/g (P1) a 758,64 ng/g (P2). Já o ERG, composto oriundo de fungos decompositores, teve suas concentrações variando de 3,04 ng/g (P1) a 201,68 ng/g (P3).

O COL variou de 3,61 ng/g (P1) a 515,90 ng/g (P3), já o COLN de 1,02 ng/g (P1) a 190,50 ng/g (P3). As máximas e mínimas desses compostos foram encontradas nos mesmos pontos amostrados.



O Coprostanol, esteroide fecal, teve concentrações variando de ND (P1)(P6) – 71,72 ng/g (P4). Esses índices podem estar relacionados com a acumulação de matéria orgânica derivada de esgotos, bem como a criação de animais domésticos como gado, caprino e suíno que ocorre na região (Refúgio de Vida Silvestre Peixe-boi Marinho, 2008).

Os valores de Coprostanol deste trabalho foram comparados com outras regiões do Brasil e do Mundo para se ter uma ideia das concentrações que são quantificadas (Tabela 9). Os níveis de Coprostanol obtidos no Rio Vaza Barris (CARREIRA *et al.*, 2015) são os mais próximos dos encontrados neste estudo.

Tabela 9: Concentrações de Coprostanol em sedimento de distintos estudos.

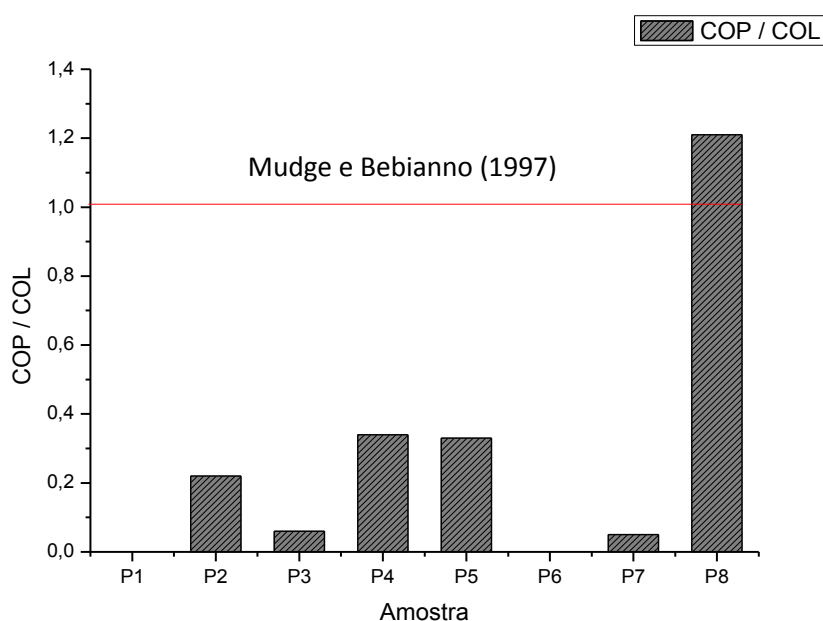
Região	Concentração de COP (ng/g)	Referência
Rio Timonha/Ubatuba – CE /PI	ND – 71	Este estudo
Rio Pacoti - CE	20 – 220	BEZERRA, 2013
Rio Acaraú - CE	6 – 124	LIMA, 2016
Canal São Sebastião – SP	ND - 620	MUNIZ <i>et al.</i> , 2015
Rio São Francisco - SE	< 10 – 14	CARREIRA <i>et al.</i> , 2015
Rio Sergipe - SE	< 10 – 184	
Rio Vaza Barris - SE	< 10 – 76	
Rio Piauí/Real - SE	< 10 – 22	
Rio da Prata - Uruguai	50 - 21200	VENTURINI <i>et al.</i> , 2015
Rio Mondego - Portugal	0,3 - 16	RADA <i>et al.</i> , 2016
Rio Danúbio - Sérvia	201 - 1939	BUJAGIĆ <i>et al.</i> , 2016
Rio da Prata - Uruguai	50 - 21200	VENTURINI <i>et al.</i> , 2015
Rio Itajaí- Açú – SC	<4 - 8930	FRENA <i>et al.</i> , 2016
Rio Aveiro - Portugal	0,04 – 11,5	RADA <i>et al.</i> , 2016
Baía Camamu – BA	Próximo ao LD: 10	CARREIRA <i>et al.</i> , 2016

Fonte: Autor

Diante dos dados apresentados na tabela 9, levando em conta apenas o COP, é possível afirmar que na área de estudo o cenário indica aporte mínimo de esgoto e/ou entrada de excretas de criação, isso em relação aos estudos realizados em ecossistemas inseridos em polos densamente urbanizados.

Na tentativa de se confirmar a contaminação por esteróis, já que não há uma concentração específica de Coprostanol que afirme essa condição foi calculado razões entre os compostos: Coprostanol, Colesterol e Coestanol que serviram como parâmetro para avaliar se a região encontra-se ou não contaminada. A razão Coprostanol e Colesterol (Gráfico 5) indicou para o P8 há contaminação fecal, ficando os outros pontos abaixo do limite de 1 determinado.

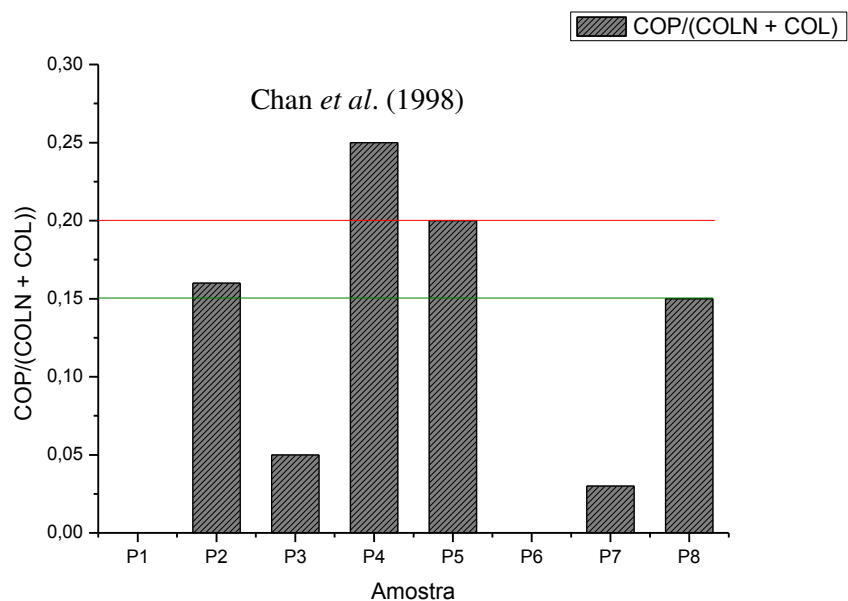
Gráfico 5: Razão Coprostanol/Colesterol



Fonte: Autor

A razão que relaciona Coprostanol, Colesterol e Coestanol (Gráfico 6) indicou, segundo Chan *et al.* (1998) contaminação para o P4, ficando o P5 no limite (0,2) sugerido pelo autor. Os pontos P1, P3, P6 e P7 foram considerados como realmente não contaminados.

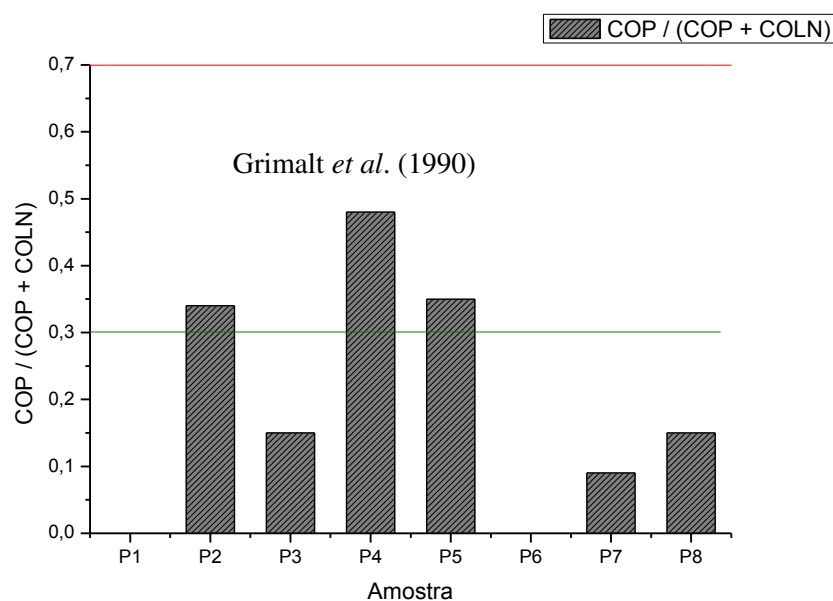
Gráfico 6: Razão Coprostanol/ (Colestanol + Colesterol)



Fonte: Autor

Ao avaliar a razão que considera Coprostanol e o soma de Coprostanol e Colestanol (Gráfico 7) todos os pontos, segundo Grimalt *et al.* (1990) ficaram abaixo do limite de 0,7 que determina a contaminação fecal.

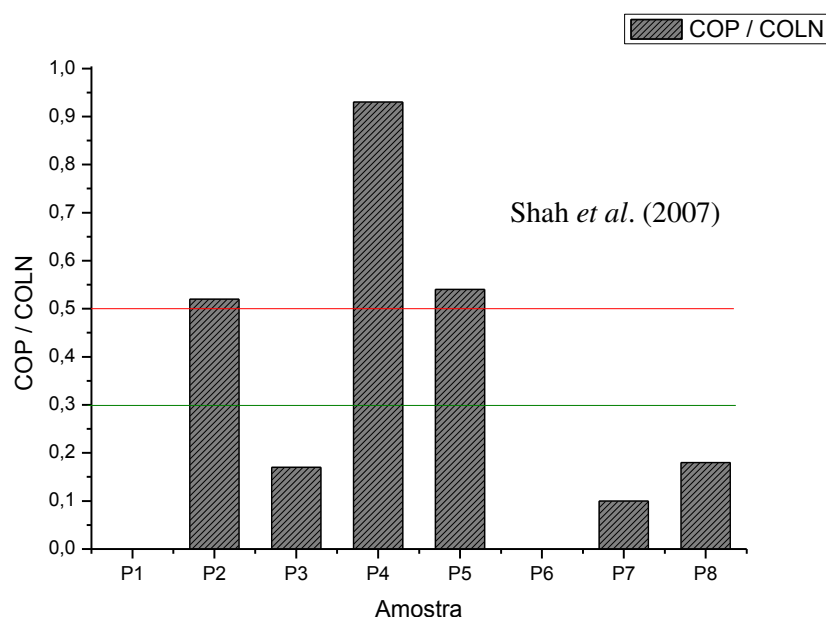
Gráfico 7: Razão Coprostanol / (Coprostanol+Colestanol)



Fonte: Autor

A última razão calculada (Gráfico 8) foi a que relaciona Coprostanol e Colestanol os pontos: P2, P4 e P5 foram considerados contaminados, já que ultrapassaram o valor limite de 0,5 para Shah *et al.* (2007). Para todas as razões os pontos P1 e P6 não puderam ser quantificados já que para eles o Coprostanol não foi detectado nesses pontos.

Gráfico 8: Razão Coprostanol / Colestanol.



Fonte: Autor.

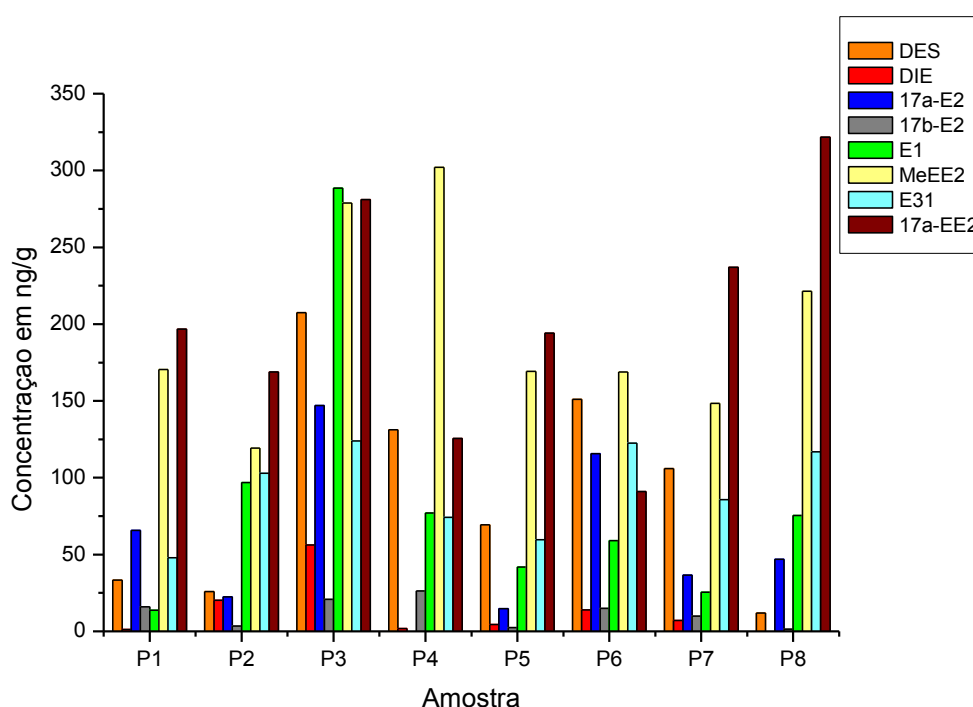
### 6.3 Concentrações de Disruptores Endócrinos (DEs) em sedimento superficial.

Após todo o processo de extração e quantificação dos compostos através da análise cromatográfica chegou-se aos valores de concentração (ng/g) em sedimento dos estrógenos avaliados nesse estudo, estes estão dispostos no Gráfico 9. Os disruptores endócrinos presentes nesse estudo são: disruptores endócrinos sintéticos Dietilestilbestrol (DES), Dienestrol (DIE), Mestranol (MeEE2) e 17 $\alpha$  – Etililestradiol (17 $\alpha$ -EE2) e os naturais 17 $\alpha$ -Estradiol (17 $\alpha$ -E2), 17 $\beta$ -Estradiol (17 $\beta$ -E2), Estrona (E1), Estriol (E3).

Os compostos sintéticos foram os que tiveram concentrações mais expressivas, isto pode estar associado aos valores de Kow que esses compostos

possuem acarretando uma maior sorção no sedimento. O somatório dos DEs por ponto variou de 67,65 a 175,46 ng/g. Dentre os sintéticos o MeEE2 e 17 $\alpha$ -EE2 destacaram-se por suas concentrações máximas de 301,09 ng/g (P4) e 321,71 ng/g (P8) respectivamente. O fato desses compostos serem encontrados na região evidencia o lançamento de efluentes domésticos no meio ambiente, já que eles são estrógenos sintéticos, ou seja, são sintetizados artificialmente por indústrias químicas e laboratórios, e são usados pela população como pílulas contraceptivas e em tratamentos de reposição hormonal (LIMA, 2016).

Gráfico 9: Concentrações de DEs em sedimento.



Fonte: Autor

As concentrações de DES variaram de 11,85 ng/g no P8 a 207,38 ng/g no P3. O DIE foi de não detectado (P8) a 56,17 (P3). O MeEE2 variou de 119,24 (P2) a 301,99 (P4). Já o 17 $\alpha$ -EE2 de 91,04 (P6) a 321,71 (P8).

Os DEs naturais: 17 $\alpha$ -E2 variou de não detectado (P4) a 147,09 (P3); 17 $\beta$ -E2 de 1,41 (P8) a 26,28 (P4); E1 13,72 (P1) a 288,44 (P3), já o E3 variou de 43,97 (P1) a 123,96 (P3). Esses compostos são produzidos e eliminados diariamente pelos seres humanos e animais em grandes quantidades (TERNES et al., 1999). O 17 $\alpha$ -E2 é rapidamente oxidado a E1, isto acontece em poucas horas, ele, então, pode ser convertido a E3, o principal excremento produzido, isto pode

acontecer de uma forma mais lenta que o processo anterior (TERNES; KRECKEL; MUELLER, 1999). A efeito de comparação, na tabela 10 encontra-se valores DEs encontrados em outras regiões.

Tabela 10: Concentrações de DEs encontradas em outros estudos.

Região	Concentração de DEs (ng/g)		Referência
Lagoa do Catu – Ceará	E1	84 – 510	MORAIS, 2014
	17 $\alpha$ -E2	0 – 95	
	17 $\beta$ -E2	0 – 196	
	17 $\alpha$ -EE2	169 – 1314	
	DES	119 – 1006	
	E3	1,7 – 94	
Rio Acarau – Ceará	DES	ND – 1474,07	LIMA, 2016
	DIE	ND – 50,53	
	17 $\alpha$ -E2	ND – 208,40	
	17 $\beta$ -E2	ND – 29,50	
	E1	ND – 73,83	
	MeEE2	2,77 – 251,67	
	E3	0,07 – 25,41	
	17 $\alpha$ -EE2	51,19 – 153,81	
Manguezal do Rio Joanes (Área de Proteção ambiental) – Salvador	E1	ND – 1,25	FROEHNER <i>et al.</i> , 2012
	E2	ND – 0,76	
	17 $\alpha$ -EE2	ND – 12,53	
Baía Maluan - China	E1	0.82 - 1.87	WANG <i>et al.</i> , 2017)
	E3	1.23 - 7.19	
	E2	1.18 - 4.10	
	EE2	1.06 - 2.19	
	DES	1.53 - 3.57	
Rio Liao - China	E1	0,06- 0,20	KE <i>et al.</i> , 2015
	E3	ND- 0,18	
	E2	ND- 0,23	
	EE2	ND- 0,18	
Baía Xiamen – China	E1	ND – 7,38	ZHANG <i>et al.</i> , 2009
	E2	ND – 2,35	
	DES	1.25 – 8,79	
	17 $\alpha$ -EE2	ND – 2,18	

Fonte: Autor

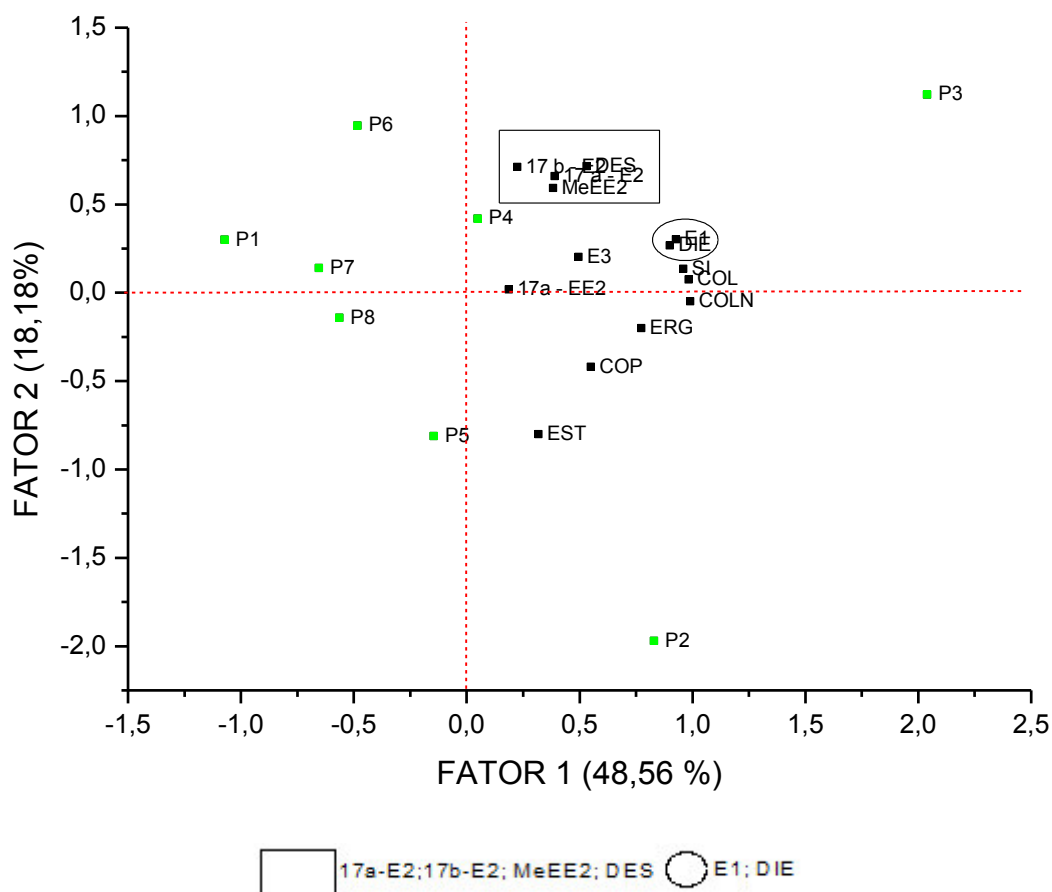
No Brasil há poucos estudos acerca dos DEs, principalmente em matriz ambiental. Diante desse desafio e como está apresentado na tabela 10, é possível afirmar que em estudo na região nordeste do Brasil há as maiores concentrações de DEs, principalmente para os sintéticos. Esse cenário pode ser justificado pela ausência, ou ineficiência, dos sistemas de esgotamento sanitário e agravado pelas características climatológicas do nordeste, onde há longos períodos de estiagem e assim contribui para o aumento das concentrações desses compostos.

#### **6.4 Análise de Componentes Principais (ACP)**

Antes da análise de componentes principais foram planejados alguns procedimentos com a determinação da técnica de extração: componentes principais e o número de fatores a serem extraídos. Por fim, decidiu-se o tipo de rotação desses fatores, que no caso foi o ortogonal: Varimax.

Não existe um consenso para definição dos números de fatores que devem ser extraídos. Na literatura, existem métodos para auxiliar na escolha desse número (FIGUEIREDO FILHO; SILVA JÚNIOR, 2010). A regra do *eigenvalue* (critério de Kaiser) sugere que a extração de fatores que estejam com valores de *eigenvalue* acima de um. De forma complementar, o *Scree test* (Catell 1966; 1978) recomenda a análise gráfica da dispersão observando até onde a curva da variância individual de cada fator se torne horizontal ou sofra uma queda abrupta. Adicionalmente, tem-se ainda o critério da variância acumulada que de acordo com Hair et al (2006) um total mínimo de 60% é aceitável. Assim, a extração deve ser efetuada até que esse número seja atingido. Seguindo todas as sugestões citadas acima a ACP para os compostos estudados (Gráfico 10) foi realizada utilizando o *software Statistica 7*.

Gráfico 10: PCA



Fonte: Autor

A análise de componentes principais mostrou que o Fator 1 explicou 48,56 % da variância total e dentre os compostos que estão relacionados positivamente com este fator, os disruptores endócrinos: DES e DIE, bem como o esteroide fecal COP estão associados a efluentes domésticos, o que sugere que os pontos P2, P3, P4 recebem essa influência antrópica, sendo que o P4 possui um aporte significativo de efluentes domésticos e os outros dois pontos podem ser considerados como tendo uma menor poluição por esgotos.

O Fator 2 explicou apenas 18,18% da variância total. O 17a-E2, 17b-E2, MeEE2 e DES relacionam positivamente com esse fator. Assim, pode-se sugerir que os pontos P1, P4, P6, P7 são oriundos de fonte mista. Já valores negativos estão associados à baixa entrada desses compostos. Como observado o P4 relaciona-se



com ambos os fatores. Através da análise de componente principal, o P5 e P8 não se relacionaram com nenhum dos fatores.

### 6.5 Coeficiente de correlação não linear Spearman

Para avaliar se os esteróis e o disruptores endócrinos tem relação com as frações orgânicas e inorgânicas do sedimento foram estimados os coeficientes de correlação de Spearman ao nível de significância de  $p < 0,05$ . Os dados mostram que o COP, COL, COLN e ERG possuem dependência pela fração lamosa do sedimento e o inverso acontece com a fração arenosa sendo a disposição menos abundante nessa granulometria sedimentar. Dentre esses compostos, o COP e COLN ainda tiveram afinidade com os ácidos húmicos (AH), bem como o E1. Já para a fração fúlvica do sedimento o DIE, COL, COLN e ERG e Si tiveram correlação positiva. Ao verificar a MO, apenas o E3-1 dependeu dessa fração.

Tabela 11: Coeficiente de correlação não linear Spearman

Compostos	Areia(%)	Lama(%)	AH	AF	MO %
DES					
DIE				0,809524	
17 α E2					
17 b E2					
E1			0,666667		
MES					
E3					0,738095
17 α EE2					
COP	-0,742528	0,802410	0,646718		
COL	-0,809524	0,761905		0,880952	
COLN	-0,738095	0,761905	0,714286	0,785714	
ERG	-0,928571	0,904762		0,952381	
EST					
Si				0,833333	

Fonte: Autor

## **7. CONSIDERAÇÕES FINAIS**

De acordo com a metodologia utilizada foi possível identificar e quantificar os compostos de interesse, bem como mensurar o grau de contaminação para os pontos amostrados a partir de índices para o Coprostanol. As concentrações desse composto variaram de ND – 71 ng/g, sendo os pontos P2, P4, P5 e P8 foram classificados como contaminados. O mais expressivo entre esses pontos foi o P4 que das quatro razões utilizadas, foi classificado como contaminado em duas. Dentre os disruptores endócrinos, os compostos sintéticos tiveram valores de concentração mais expressivos. Com a análise de componente principal foram estimadas aporte de fontes naturais e efluentes domésticos.

## REFERÊNCIAS

- ANVISA - AGENCIA NACIONAL DE VIGILANCIA SANITARIA. *Guia para validação de metodos analiticos e bioanaliticos*, Resolucao RE nº899 de 29/05/2003. Diario Oficial da Republica Federativa do Brasil, Brasilia, DF, 2003.
- ARAÚJO, B. R. N.; et al. Diagnóstico Geoquímico do Manguezal do Estuário do Rio Itanhém, Alcobaca-BA: Análise da Matéria Orgânica e Teores de Metais Pesados no Substrato Lamoso. in: mangrove 2000, sustainable use of estuaries and mangrove: challenges and prospects. 2000. Recife. Anais. Recife, 2000, p.31.
- BAYONA, J.M.; ALBAIGES, J. Sources and fate of organic contaminants in the marine environment. Barcelona, 2004. 55 p
- BENITES, V. M.; MADARI, B.; MACHADO, P. L. O. A. Extração e Fracionamento Quantitativo de Substâncias Húmicas do Solo: um Procedimento Simplificado de Baixo Custo. Rio de Janeiro: Embrapa Solos, 2003. (Embrapa Solos. Comunicado Técnico, 16).
- BEZERRA, M. F. Esteróis fecais utilizados como indicadores de contaminação por lançamento de esgoto - rio Pacoti, Ceara. 43f. Monografia (graduação em Oceanografia) - Universidade Federal do Ceara, Instituto de Ciências do Mar, Fortaleza - CE, 2013.
- BRAGA, R. A. P. Caracterização das Zonas Estuarinas de Pernambuco. In: seminário internacional, perspectivas e implicações da carcinicultura estuarina de estado de pernambuco, 1, 2000, Recife. Anais... Editora Bagaço, Recife, 2000, p.13-20.
- BUJAGIĆ, Ivana Matić et al. Sterol ratios as a tool for sewage pollution assessment of river sediments in Serbia. *Environmental Pollution*, [s.l.], v. 213, p.76-83, jun. 2016. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.envpol.2015.12.036>.
- CAMARGO, O.A.; MONIZ, A.C.; JORGE, J.A.; VALADARES, J.M.A.S. Métodos de Análise Química, Mineralógica e Física de Solos do Instituto Agrônomo de Campinas. Campinas, Instituto Agrônomo, 2009. 77 p. (Boletim técnico, 106, Edição revista e atualizada).
- CAMPOS, Alberto et al. Guia fotográfico: Aves costeiras da APA Delta do Parnaíba. Parnaíba, 2016.
- CARABALLO, P.; VALENCIA, M. Impactos Ambientales de la Camaronicultura. In: seminário internacional, perspectivas e implicações da carcinicultura estuarina de estado de pernambuco, 1, 2000, Recife. Anais... Editora Bagaço, Recife, 2000, p.47-58.
- CARLOS, Luciano et al. Photochemical fate of a mixture of emerging pollutants in the presence of humic substances. *Water Research*, [s.l.], v. 46, n. 15, p.4732-4740, out. 2012. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.watres.2012.06.022>.

CARREIRA, R. S.; CORDEIRO, L. G. M. S.; BERNARDES, M. C.; HATJE, V. Distribution and characterization of organic matter using lipid biomarkers: A case study in a pristine tropical bay in NE Brazil. *Coastal and Shelf Science* 168, 2016.

CARREIRA, Renato S. et al. Changes in the sedimentary organic carbon pool of a fertilized tropical estuary, Guanabara Bay, Brazil: an elemental, isotopic and molecular marker approach. *Marine Chemistry*, [s.l.], v. 79, n. 3-4, p.207-227, out. 2002. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/s0304-4203\(02\)00065-8](http://dx.doi.org/10.1016/s0304-4203(02)00065-8).

CARREIRA, Renato S. et al. Evidence of sewage input to inner shelf sediments in the NE coast of Brazil obtained by molecular markers distribution. *Marine Pollution Bulletin*, [s.l.], v. 90, n. 1-2, p.312-316, jan. 2015. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.marpolbul.2014.11.011>.

CAVALCANTE, R.M; LIMA, D. M.; CORREIA, L.M.; NASCIMENTO, R.F. Técnicas de extrações e procedimentos de *clean-up* para a determinação de hidrocarbonetos policíclicos. aromáticos (HPA) em sedimentos da costa do Ceará. *Quimica Nova*, v. 31, n. 6, p. 1371- 1377, 2008.

CHAN, K. H.; LAM, M. H. W.; POON, K. F.; YEUNG, H. Y.; CHIU, T. K. T. Application of sedimentary fecal stanols and sterols in tracing sewage pollution in coastal waters. *Water Research*, v. 32, n. 1, p. 225-235, 1998.

CHATTON, E. et al. Glacial recharge, salinisation and anthropogenic contamination in the coastal aquifers of Recife (Brazil). *Science Of The Total Environment*, [s.l.], v. 569-570, p.1114-1125, nov. 2016. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.scitotenv.2016.06.180>.

CLARK, R. B. (2001). *Marine Pollution*. Oxford University Press, USA. 248 p.

COTTA, J. A. O.; REZENDE, M. O. O.; PIOVANI, M. R. Avaliação do teor de metais em sedimento do Rio Betari no Parque Estadual Turístico do Alto Ribeira – Petar, São Paulo, Brasil. *Quimica Nova*, v. 29, n. 1, p. 40-45, 2006.

DAY, J.H., 1980. What is an estuary? *South African Journal of Science* 76, 198.

DAY, J.H., 1981. The nature, origin and classification of estuaries. In: Day, J.H. (Ed.), *Estuarine Ecology: With Particular Reference to Southern Africa*. Balkema, Rotterdam, pp. 1–6.

DIAS, Carolina Braga. Dinâmica do sistema estuarino timonha / ubatuba (ceará – brasil): considerações ambientais. 2005. 146 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Ciências Marinhas Tropicais, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2005.

DUAVÍ, Wersângela Cunha. Impacto do uso de domissanitários no combate a pragas urbanas – estudo de caso em manguezais da região metropolitana de fortaleza – ce. 2013. 48 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Oceanografia, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2013.

EGANHOUSE, R. P. Molecular Markers in Environmental Geochemistry. *American Chemical Society Symposium Series 671*. American Chemical Society, Washington, DC, 1997.

ELLIOTT, M.; WHITFIELD, A.k.. Challenging paradigms in estuarine ecology and management. *Estuarine, Coastal And Shelf Science*, [s.l.], v. 94, n. 4, p.306-314, out. 2011. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ecss.2011.06.016>.

FIGUEIREDO FILHO, Dalson Brito; SILVA JÚNIOR, José Alexandre da. Visão além do alcance: uma introdução à análise fatorial. *Opinião Pública*, [s.l.], v. 16, n. 1, p.160-185, jun. 2010. Fap UNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/s0104-62762010000100007>.

FRENA, Morgana et al. Assessment of anthropogenic contamination with sterol markers in surface sediments of a tropical estuary (Itajaí-Açu, Brazil). *Science Of The Total Environment*, [s.l.], v. 544, p.432-438, fev. 2016. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.scitotenv.2015.11.137>.

FROEHNER, Sandro et al. Occurrence of selected estrogens in mangrove sediments. *Marine Pollution Bulletin*, [s.l.], v. 64, n. 1, p.75-79, jan. 2012. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.marpolbul.2011.10.021>.

GOMES, R. L.; AVCIOGLU, E.; SCRIMSHAW, M. D.; LESTER, J. N. Steroid estrogen determination in sediment and sewage sludge: a critique of sample preparation and chromatographic/mass spectrometry considerations, incorporating a case in method development. *Trends in Analytical Chemistry*, v.23, n.10-11, p.737-743, 2004.

GRIMALT, J.O., Fernández, P., Bayona, p., and Albaiges, J. (1990). Assessment of fecal sterols and ketones as indicators of urban sewage inputs to coastal waters. *Environmental Science & Technology* 357-363.

KAPSIMALIS, V. et al. Organic contamination of surface sediments in the metropolitan coastal zone of Athens, Greece: Sources, degree, and ecological risk. *Marine Pollution Bulletin*, [s.l.], v. 80, n. 1-2, p.312-324, mar. 2014. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.marpolbul.2013.12.051>.

KE, Xin et al. Characterization of estrogenic receptor agonists and evaluation of estrogenic activity in the sediments of Liaohe River protected areas. *Marine Pollution Bulletin*, [s.l.], v. 100, n. 1, p.176-181, nov. 2015. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.marpolbul.2015.09.008>.

LIMA, Marcielly Freitas Bezerra de. Esteróis e disruptores endócrinos em sedimentos como indicadores da contaminação no rio Acaraú-ce. 2016. 86 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Programa de Pós-graduação em Ciências Marinhas Tropicais, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2016.

LOURENÇO, R.A. Metodologia para determinação de biomarcadores geoquímicos orgânicos em sedimentos – hidrocarbonetos alifáticos e aromáticos, esteróis e alquenonas. São Paulo, 2003. Dissertação (Mestrado em Ciências, área de Oceanografia Química e Geológica) – Instituto Oceanográfico da Universidade de São Paulo.

MAIA, Dr. Luis Parente et al. Estudo das áreas de manguezais do Nordeste do Brasil. Fortaleza: ., 2005. 62 p

MARTINS, C.C., Fillmann, G., and Montone, R.C. (2007). Natural and anthropogenic sterols inputs in surface sediments of Patos lagoon, Brazil. *Journal of Brazilian Chemical Society* 18, 106-115.

MEIRELES, Antonio Jeovah de Andrade; CAMPOS, Alberto Alves. Componentes geomorfológicos, funções e serviços ambientais de complexos estuarinos no nordeste do Brasil. *Revista da Anpege.*, v. 6, p.89-107, 2010.

MEYER, Armando et al. Estarão alguns grupos populacionais brasileiros sujeitos à ação de disruptores endócrinos? *Cad. Saúde Pública*, Rio de Janeiro: 15 (4):845-850, out-dez, 1999.

MINISTÉRIO DO MEIO AMBIENTE. Unidades de Conservação: Categorias. Disponível em: <<http://www.mma.gov.br/areas-protegidas/unidades-de-conservacao/categorias>>. Acesso em: 1 dez. 2016.

MINISTÉRIO DO MEIO AMBIENTE. Unidades de Conservação: O que são. Disponível em: <<http://www.mma.gov.br/areas-protegidas/unidades-de-conservacao/o-que-sao>>. Acesso em: 1 dez. 2016.

MORAIS, P. C. V. Diagnóstico ambiental da poluição por esgotos utilizando interferentes endócrinos e esteróis fecais - Lagoa do Catu, Aquiraz – *Ceará Fortaleza (CE)*, 2014. 79 f. Dissertação (mestrado) - Universidade Federal do Ceará, Instituto de Ciências do Mar, Fortaleza - CE, 2014.

MUDGE, S. M.; BEBIANNO, M. J. Sewage contamination following in a accidental spillage in the Ria Formosa, Portugal. *Marine Pollution Bulletin*, v. 34, n. 3, p. 163-170, 1997.

MUNIZ, P. et al. Sewage contamination in a tropical coastal area (São Sebastião Channel, SP, Brazil). *Marine Pollution Bulletin*, [s.l.], v. 99, n. 1-2, p.292-300, out. 2015. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.marpolbul.2015.07.046>.

OLEA et al. Disruptores endócrinos: una historia muy personal y con múltiples personalidades. *Gaceta Sanitaria*, Barcelona: v.16 n.3, May/june 2002.

PESSOA, G. D. P. Avaliação de desreguladores endócrinos e do micropoluente colesterol em estações de tratamento de esgoto sanitário. Tese (doutorado) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Tecnologia, Departamento de Engenharia Hidráulica e Ambiental, Programa de Pós-Graduação em Engenharia Civil, Fortaleza, 2012.

POTTER, Ian C. et al. The concept of an estuary: A definition that incorporates systems which can become closed to the ocean and hypersaline. *Estuarine, Coastal And Shelf Science*, [s.l.], v. 87, n. 3, p.497-500, abr. 2010. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ecss.2010.01.021>.

PRITCHARD, R.W., 1967. What is an estuary? Physical viewpoint. In: Lauff, G.H. (Ed.), *Estuaries*. American Association for the Advancement of Science, Washington D.C., pp. 3–5.

RADA, Jesica P.a. et al. Sewage contamination of sediments from two Portuguese Atlantic coastal systems, revealed by fecal sterols. *Marine Pollution Bulletin*, [s.l.], v. 103, n. 1-2, p.319-324, fev. 2016. Elsevier BV.  
<http://dx.doi.org/10.1016/j.marpolbul.2016.01.010>.

SANTOS, A. et al. Características dos ecossistemas estuarinos Brasileiros e as atividades antrópicas. Acessado em 5/11/2016, disponível em:  
[http://www.prex.ufc.br/formularios/Meio\\_Ambiente\\_2006/ECOSSISTEMAS%20ESTUARINOS%20BRASILEIROS](http://www.prex.ufc.br/formularios/Meio_Ambiente_2006/ECOSSISTEMAS%20ESTUARINOS%20BRASILEIROS). Pdf

SHAH, V. G.; HUGH DUNSTAN, R.; GEARY, P. M.; COOMBES, P.;ROBERTS, T. K.;VON NAGY-FELSOBUKI, E. Evaluating potential applications of faecal sterols in 82 distinguishing sources of faecal contamination from mixed faecal samples. *Water Research*, v. 41, n. 16, p. 3691-3700, 2007.

SHEPARD, F. P. Nomenclature based on sand-silt-clay ratios. *Journal of Sedimentary Research*, v. 24, n. 3, p. 151-158, 1954.

SILVA, Carla Grazieli Azevedo da; COLLINS, Carol H.. Aplicações de cromatografia líquida de alta eficiência para o estudo de poluentes orgânicos emergentes. *Química Nova*, [s.l.], v. 34, n. 4, p.665-676, 2011. FapUNIFESP (SciELO).  
<http://dx.doi.org/10.1590/s0100-40422011000400020>.

STEFENS, J.L. (2006). Caracterização molecular de compostos orgânicos biogênicos e antropogênicos em sedimentos da lagoa Rodrigo de Freitas, Rio de Janeiro (RJ). Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 127 p.

SUGUIO, K. Introdução à Sedimentologia. São Paulo, Ed. da Universidade de São Paulo, 1973.

TAKADA, H.; EGANHOUSE, R. P. Molecular markers of anthropogenic waste. In: *Encyclopedia of Environmental Analysis and Remediation*; Meyers, R. A., Ed. John Wiley e Sons; New York, p. 2883-2940, 1998.

TERNES, T.a et al. Behavior and occurrence of estrogens in municipal sewage treatment plants — I. Investigations in Germany, Canada and Brazil. *Science Of The Total Environment*, [s.l.], v. 225, n. 1-2, p.81-90, jan. 1999. Elsevier BV.  
[http://dx.doi.org/10.1016/s0048-9697\(98\)00334-9](http://dx.doi.org/10.1016/s0048-9697(98)00334-9).

TERNES, T.a; KRECKEL, P; MUELLER, J. Behaviour and occurrence of estrogens in municipal sewage treatment plants — II. Aerobic batch experiments with activated sludge. *Science Of The Total Environment*, [s.l.], v. 225, n. 1-2, p.91-99, jan. 1999. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/s0048-9697\(98\)00335-0](http://dx.doi.org/10.1016/s0048-9697(98)00335-0).

United States Pharmacopeia Convention; *US Pharmacopeia 24*, Validation of Compendial Methods <1225>, Rockville, 1999.

VENKATESAN, M.i.; MIRSADEGHI, F.h.. Coprostanol as sewage tracer in McMurdo Sound, Antarctica. *Marine Pollution Bulletin*, [s.l.], v. 25, n. 9-12, p.328-333, jan. 1992. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/0025-326x\(92\)90691-x](http://dx.doi.org/10.1016/0025-326x(92)90691-x).

VENTURINI, Natalia et al. A multi-molecular marker assessment of organic pollution in shore sediments from the Río de la Plata Estuary, SW Atlantic. *Marine Pollution*

Bulletin, [s.l.], v. 91, n. 2, p.461-475, fev. 2015. Elsevier BV.  
<http://dx.doi.org/10.1016/j.marpolbul.2014.06.056>.

VOLKMAN, J.K. (1986). Review of sterol markers fat marine and terrigenous matter. *Organic Geochemistry* 9, 83-99.

WANG, Zaosheng et al. Estrogenic compound profiles in an urbanized industry-impacted coastal bay and potential risk assessment by pollution indices and multivariate statistical methods. *Marine Pollution Bulletin*, [s.l.], v. 114, n. 1, p.397-407, jan. 2017. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.marpolbul.2016.09.050>.

WU, Jianguo. Urban ecology and sustainability: The state-of-the-science and future directions. *Landscape And Urban Planning*, [s.l.], v. 125, p.209-221, maio 2014. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.landurbplan.2014.01.018>.

YING, G.; KOOKANA, R.; RU, Y. Occurrence and fate of hormone steroids in the environment. *Environment international*, v. 28, n. 6, p. 545-551, 2002.

ZHANG, Xian et al. Levels of estrogenic compounds in Xiamen Bay sediment, China. *Marine Pollution Bulletin*, [s.l.], v. 58, n. 8, p.1210-1216, ago. 2009. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.marpolbul.2009.03.011>.